

Implementierung der akustischen Levitation in ein Totalanalysesystem

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Carsten Warschat

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Panne
2. Prof. Dr. Dietrich Volmer

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2018

*Für die, die ich Familie nenne.
Für die, die ich Freunde nenne.*

Abstract

As a total analysis system (TAS) an instrument is called which carries out complete chemical analysis procedures independently. The introduction of such systems offers a more efficient workflow in analytical laboratories because the sample manipulation, purification and the actual automated analysis can be carried out in one single operation. Specialized and already existing micro total analysis systems require currently a small amount of sample in the μL range. Owing to contamination, agglomeration and thus cross-section reduction of incorporated channels in microfluidics total analysis systems it can lead to a complete system interruption. Hence, the implementation of acoustic levitation in these systems is interesting alternative in order to avoid such kind of problems by abandoning vessels and wall contacts completely. To ensure acoustic levitation in micro total analysis systems can be successfully applied, technical development of analytical methods and coupling techniques is required.

In the present work, the coupling of levitation technology and mass spectrometry is the prioritized topic but, in addition, spectroscopic experiments based on total reflections within the levitated droplet are as well realized in order to gain process insights. The particularly good reflection at the freely levitated droplet's circumference is due to the fact that the phase boundary between air and liquid is renewed by molecular interactions constantly and has no production-related rough surface. The combination of automated droplet generation, spectroscopy as well as the developed method for ion generation from the sample volume and mass spectrometry forms the basis of a novel micro total analysis system for small sample quantities.

Zusammenfassung

Als Totalanalyzesysteme (TAS) werden Geräte bezeichnet, welche komplette chemische Analysen eigenständig ausführen. Die Einführung solcher Systeme ermöglicht einen effizienteren Arbeitsablauf in Analyselaboren, da beispielsweise die Probenmanipulation, Aufreinigung und die physikalisch-/chemische Analyse automatisiert in einem Arbeitsgang durchgeführt werden können. Die speziellen Mikrototalanalyzesysteme benötigen geringere Probemengen im μL -Bereich. Durch Kontamination, Agglomeration oder einem Verschluss etwaiger Kanäle in mikrofluidischen Totalanalyzesystemen kann es zu einem kompletten Systemausfall kommen. Eine Alternative bildet die akustische Levitation, um derartige Störfälle durch gänzlichen Verzicht auf Gefäße und Wandkontakte gezielt zu reduzieren. Damit die akustische Levitation erfolgreich in Mikrototalanalyzesystemen Anwendung finden kann, bedarf es der technischen Weiterentwicklung von Analysemethoden und Kopplungstechniken.

In der vorliegenden Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf die Kopplung von Levitationstechnik und Massenspektrometrie gelegt. Darüber hinaus wurden spektroskopische Experimente durchgeführt, welche auf Totalreflektionen innerhalb der Tropfen beruhen. Die besonders gute Reflektion hängt damit zusammen, dass sich die Phasengrenze zwischen Luft und Flüssigkeit im Schwebezustand durch molekulare Wechselwirkungen ständig erneuert und keine produktionsbedingte raue Oberfläche aufweist. Die Kombination aus automatischer Tropfengenerierung, Spektroskopie sowie der entwickelten Methode zur Ionenerzeugung aus dem Probevolumen und der massenspektrometrischen Analyse bilden die Grundlage eines neuartigen Mikrototalanalyzesystems für geringe Probemengen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Totalanalysesysteme in der analytischen Chemie | 2 |
| 1.2 Zielstellung | 4 |
| 2 Methodische Grundlagen | 7 |
| 2.1 Levitationsmethoden in der analytischen Chemie | 8 |
| 2.2 Massenspektrometrie | 13 |
| 2.3 Spektroskopische Methoden am levitierten Tropfen | 17 |
| 3 Anpassung der verwendeten Geräte | 19 |
| 3.1 Einleitung | 20 |
| 3.2 Reflektor und Schallfeld | 21 |
| 3.3 Tropfeninjektion und Mischungsverhalten | 23 |
| 3.4 Massenspektrometereinlass | 27 |
| 3.5 Ionenquelle Sprayionisation | 30 |
| 4 Laserdesorption/ionisation aus akustisch levitierten Tropfen | 33 |
| 4.1 Einleitung | 34 |
| 4.2 Experimenteller Aufbau | 38 |
| 4.3 Ergebnisse und Diskussion | 41 |
| 4.4 Zusammenfassung und Ausblick | 47 |
| 5 Sonic Spray Ionization | 49 |
| 5.1 Sonic Spray Ionisation als kontinuierliche Tropfenquelle | 50 |
| 5.2 Nutzen der erhaltenen Informationen für Totalanalysesysteme | 52 |
| 5.3 Experimenteller Aufbau | 53 |
| 5.4 Ergebnisse und Diskussion | 55 |
| 5.5 Zusammenfassung und Ausblick | 66 |
| 6 Field Induced Droplet Ionisation Assisted by Ultra Sound | 69 |
| 6.1 Field Induced Droplet Ionization | 70 |
| 6.2 Experimenteller Aufbau | 74 |
| 6.3 Ergebnisse und Diskussion | 76 |
| 6.4 Zusammenfassung und Ausblick | 84 |

| | |
|--|-----|
| 7 Postionisationsmethoden | 87 |
| 7.1 Einleitung | 88 |
| 7.2 Plasmabasierte Postionisation | 89 |
| 7.3 Zusammenfassung und Ausblick | 100 |
| 8 Optische Spektroskopie in der Whispering Gallery Mode von levitierten Tropfen | 105 |
| 8.1 Einleitung | 106 |
| 8.2 Experimenteller Aufbau | 110 |
| 8.3 Ergebnisse und Diskussion | 112 |
| 8.4 Zusammenfassung und Ausblick | 117 |
| 9 Schlussbetrachtungen | 119 |
| 9.1 Instrumentelle Neuerungen | 120 |
| 9.2 Fazit | 123 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Prinzip der akustischen Levitation und Wirkung der Schallwelle auf den levitierten Tropfen. | 11 |
| 2.2 | Aufbau des Levitators vor dem Einlass in das verwendete Massenspektrometer. | 12 |
| 3.1 | Abbildung der durch Berechnung erhaltenen Schallfeldsimulation (rot: hoher Schalldruck, blau: niedriger Schalldruck). | 21 |
| 3.2 | Reflektoren, welche mit Hilfe eines 3D-Druckers produziert wurden. | 22 |
| 3.3 | Darstellung eines gegossenen Reflektors mit eingearbeitetem Injektionssystem. | 24 |
| 3.4 | Tropfeninjektion sowie eine chronologische Beobachtung des Mischungsverhaltens. | 26 |
| 3.5 | Schallfrequenz-induzierte Tropfenverformung. | 27 |
| 3.6 | Darstellung des Einlasses, welcher genutzt wird, wenn die mitgelieferte APCI Quelle eingesetzt wird. | 28 |
| 3.7 | Einlass für entferntere Ionisationregionen. | 29 |
| 3.8 | Für Ionisationstechniken mit erhöhter Spannung ist ein elektrisch isoliertes PEEK-System mit separatem Einlass dargestellt. | 30 |
| 3.9 | Genutzte Ionenquelle zur Sprayionisation. | 31 |
| 4.1 | Schematische Darstellung des LDI Aufbaus. | 38 |
| 4.2 | Strukturformeln der für die LDI verwendeten Analyten inklusive deren molekularer Masse. | 41 |
| 4.3 | Laser Desorption/Ionisation (LDI) Spektrum eines 5 μ L Tropfens einer 100 μ M L-Arginin Lösung (der gerade m/z Wert für das $[3 \text{ Arg}+\text{H}]^+$ Signal resultiert aus Rundungen; die exakte Masse ist 523,61 Da). | 42 |
| 4.4 | LDI Spektrum von 5 μ L Tropfen einer 100 μ M Reserpin Lösung (der gerade m/z Wert für das $[\text{Res}+\text{H}]^+$ Signal resultiert aus Rundungen; die exakte Masse ist 609,69 Da). | 43 |
| 4.5 | LDI Spektrum von 5 μ L Tropfen einer 100 μ M Bradykinin Lösung; die exakte Masse von Bradykinin ist 1060,23 Da. | 44 |
| 4.6 | LDI Spektrum eines 5 μ L Tropfens einer 100 μ M Rifampicin Lösung; die exakte Masse von Rifampin ist 822,94 Da. | 46 |
| 4.7 | LDI Spektrum von Vancomycin aus einem 5 μ L Tropfen einer 100 μ M Vancomycinhydrochlorid Lösung; die exakte Masse von Bradykinin ist 1449,30 Da. | 46 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Experimenteller Aufbau: a) Foto der Airbrush Pistole vor dem MS Einlass. b) Schema der benutzten Airbrush Pistole. c) Schematische Darstellung der Atmosphärendruck-Kopplung des verwendeten MS. | 53 |
| 5.2 | Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von L-Lysin (146,19 Da) aus 1:1 MeOH/H ₂ O Mischungen. | 56 |
| 5.3 | Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von Reserpin (609 Da) aus 1:1 MeOH/H ₂ O Mischungen. | 56 |
| 5.4 | Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von Vancomycin (1450 Da) aus 1:1 MeOH/H ₂ O Mischungen. | 57 |
| 5.5 | Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von Lysozym (14,3 kDa) aus H ₂ O. | 57 |
| 5.6 | Extrahiertes Ionen Chromatogramm von a) [Lys+H] ⁺ und b) [2MeOH+H] ⁺ , Ionensignale aus 0,1 mmol · L ⁻¹ L-Lysin Lösung. | 59 |
| 5.7 | Zwei SSI Spektren von 0.1 mmol · L ⁻¹ L-Lysin Lösungen, aufgenommen im Abstand von zwei Wochen. Das rote Spektrum hat einen Offset zur Verdeutlichung. | 59 |
| 5.8 | LIF Abbildungen des SSI Sprays. a) Fluoreszenzsignal von Rhodamin B in 1:1 MeOH/H ₂ O akkumuliert über 2000 Pulse des anregenden Lasers; b) gesamte Fluoreszenzintensitäten Karte, dargestellt in Falschfarben, c) mittiger Schnitt durch die rekonstruierte 3D Verteilung von b); d) gesamte Fluoreszenzintensität, gefiltert durch UV-Kaltlichtspiegel, nur Fluoreszenz über 556 nm (solvatisiertes Rhodamin B) wird detektiert; e) Differenzbildung zwischen b) und d), nur Fluoreszenz unter 556 nm (desolvatisiertes Rhodamin B) wird detektiert. Der Kreis beschreibt die Lade des Einlass in den MS Experimenten. | 61 |
| 5.9 | Einzeltröpfchenuntersuchungen: a) Mehrfache Belichtung des Spraykegels in Falschfarbendarstellung; b) einzelne Belichtungen des Kegels, Darstellung der Tropfenverteilung in x,y-Ebene; c) Histogramm der Tropfen/Volumen-Verteilung. | 64 |
| 6.1 | Experimenteller Aufbau der <i>Field Induced Droplet Ionization Assisted by Ultra Sound</i> (FIDIBUS). | 75 |
| 6.2 | Simulation der Isopotentiallinien in verschiedenen untersuchten Anordnungen von Nadel- und Ringelektroden für ein FIDIBUS Experiment. Nadel/Nadel (o.l.), Nadel/Ring (o.r.), Ring/Ring inkl. Corona-Nadel (u.l.), ohne Corona-Nadel (u.r.). Die Isopotentiallinien geben den Gradienten des elektrischen Feldes an $\Delta U = 9$ kV. | 76 |
| 6.3 | Simulation der Potentialfläche zwischen den Elektroden bei einer Potentialdifferenz von $\delta U = 9$ kV. | 78 |
| 6.4 | Dualringkonfiguration für die Analyse mit FIDIBUS. | 78 |
| 6.5 | Zeitlich aufgelöste Oszillation eines Tropfens im akustischen Feld nach Anlegen der für FIDIBUS benötigten Spannung. | 79 |
| 6.6 | Aufbau zum Generieren von einseitigen Sprayprozessen am levitierten Tropfen. | 80 |

| | | |
|------|--|-----|
| 6.7 | Massenspektrum von FIDIBUS mit 4,5 μL Tropfen Ethanol aus Doppelelektrodenkonfiguration mit +/- 4,5 kV. | 81 |
| 6.8 | Zeitliche Darstellung der Reproduzierbarkeit des Signals bei m/z 65 (protonierter Ethanolcluster) bei FIDIBUS MS. | 82 |
| 6.9 | Erhaltenes Spektrum aus einer 7,7 mM Salicylsäuremethylester (M = 152,14) Methanol Lösung. | 82 |
| 6.10 | Beobachtungen des Sprayprozesses bei FIDIBUS. | 83 |
| 6.11 | Orthogonal angeordneter FIDIBUS Aufbau (oFIDIBUS). | 85 |
| 7.1 | Positionierungsquelle, welche zur Ionisation durchfließender in Gasphase befindlicher Analyte genutzt wird. | 92 |
| 7.2 | Elektrodenabstandshalter unterschiedlicher Innendurchmesser. | 92 |
| 7.3 | Schematische Darstellung der Glow-Discharge-Durchflusszelle, wobei die vordere Elektrode geerdet ist und die hintere wahlweise an Wechsel- oder Gleichstrom angeschlossen werden kann. | 94 |
| 7.4 | Erhaltenes Massenspektrum der Luftfeuchte ohne beigemengtes Aceton im Gasstrom mit Glow-Discharge-Ionenquelle. | 95 |
| 7.5 | Zeitliche Detektion der gebildeten Ammonium- und protonierten Wasser-Cluster. | 96 |
| 7.6 | Massenspektrum des Aceton-Headspace mit Glow-Discharge-Ionenquelle. | 96 |
| 7.7 | Massenspektrum eines Toluol/Wasser Gemisch Headspace mit Glow-Discharge-Ionenquelle. | 97 |
| 7.8 | Einfluss der unterschiedlichen AC Wellenfunktionen auf die Qualität der Massenspektren. | 98 |
| 7.9 | Kombination einer Plasma-Fackel und akustischer Levitation/Laser-Desorption. | 99 |
| 7.10 | Spektrum von Ibuprofen (M = 206,28 g mol ⁻¹) einer 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Lösung. | 100 |
| 7.11 | Orthogonal im Einlass implementierte DBDI-Plasmafackel. | 101 |
| 7.12 | Vergleich eines mittels LDI erhaltenen Massenspektrums von Fmoc-Ile-OH (M = 353,41) mit DBDI-Quelle (oben) und ohne (unten). | 102 |
| 8.1 | Aufbau des Lichtweges vom Laser bis zum Levitator. | 110 |
| 8.2 | Darstellung des grundlegenden Prinzips der Whispering Gallery Mode (WGM). | 111 |
| 8.3 | Schematische Darstellung des Brewster-Winkel θ am Ringresonator. | 113 |
| 8.4 | Sichtbares Licht am Tropfen bei unterschiedlichen Polarisationswinkeln. | 114 |
| 8.5 | Spektral aufgelöste Beobachtungen der Emissionsprozesse am Tropfen im Levitator. | 114 |
| 8.6 | Beobachtete Verschiebung des Emissionsmaximums im Verlaufe der Zeit durch Verdampfung des Methanols. | 115 |
| 8.7 | Zeitlich aufgelöster Verlauf einer Anregung der Fluoreszenz im Tropfen. | 116 |

Abkürzungsverzeichnis

AP Atmosphärendruck engl. *atmospheric pressure*

APCI atmospheric pressure chemical ionization

BBO beta-Bariumborat

CCD charge-coupled device

CI Chemische Ionisation

CRM charge residue model

DAPPI desorption atmospheric pressure photoionization

DART direct analysis in real time

DBDI Dielektrisch gehinderte Entladungsionisation (engl. *dielectric barrier discharge ionization*)

EI Elektronenstoß Ionisation

ESI electrospray ionization

FAB fast atom bombardment

FAPA flowing atmospheric-pressure afterglow

FC Faraday-Detektor engl. *faraday cup*

FD Felddesorption

FI Fieldionisation

FIDI Feld-induzierte Tropfen Ionisation Massenspektrometrie (engl. *field induced droplet ionization*)

FIDIBUS field induced droplet ionization assisted by ultra sound

HTS Hochdurchsatz Screenings (engl. *high-throughput screening*)

ICP induktiv gekoppeltes Plasma

IR Infrarot

Abbildungsverzeichnis

LDI laser desorption ionization

LIF Laser-induzierter Fluoreszenz

LWL Lichtwellenleitern

MALDI matrix assisted laser desorption/ionization

MCP microchannel plate

MS Massenspektrometrie

PEEK Polyetheretherketon

PESI probe electro spray ionization

PMT photomultiplier tube

PTFE Polytetrafluorethylen

SAMDI-MS self-assembled monolayers for matrix-assisted laser desorption/ionization
mass spectrometry

SIMS Sekundärionen-Massenspektrometrie

SPI single photon ionization

SSI sonic spray ionization

TAS Totalanalysesystem

TFA Trifluoressigsäure

ToF Flugzeitmassenspektrometern engl. *time-of-flight*

UV/Vis ultraviolett/sichtbar engl. *visible*

V-EASI Venturi easy ambient sonic spray ionization

WGM whispering gallery modes

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Totalanalyzesysteme in der analytischen Chemie

Totalanalyzesysteme (TAS) werden oftmals mit Hochdurchsatz Screenings (engl. *High throughput screening*, HTS) gleichgesetzt. Da diese in den verschiedensten Bereichen der Biologie, Chemie oder Pharmazie verwendet werden, um Stoffe aus Herstellungsprozessen oder natürlich ablaufenden Prozesse automatisiert zu erfassen und zu bewerten [1, 2], ist dieser Vergleich nur bedingt richtig. Die generelle Definition von TAS umfasst lediglich das Analysesystem und nicht dessen möglichen Durchsatz. Hinsichtlich der Charakterisierung chemisch und biologisch aktiver Substanzen, in z.B. der Medikamentenforschung, kann es jedoch Anwendungen geben, die mehr als 100.000 generierte Messdaten pro Tag umfassen [3], die korrekterweise als HTS bezeichnet werden. Einer der bekanntesten Hilfsmittel für diese Studien ist die in Immunoassay-Analysen verwendete Mikrotiterplatte. Deren Entwicklung in den vergangenen Jahren zeigt anschaulich den Trend zum stetig leistungsfähigeren HTS. Während Anfang der 90er Jahre Platten mit 96 Vertiefungen (engl. Wells) produziert wurden, sind heutzutage Platten mit 9.600 Wells erhältlich. Gleichzeitig konnte die Volumenkapazität von mehreren hundert auf zehn Mikroliter verringert werden.

In massenspektrometrischen Analysen werden die Anforderungen niedriger angesetzt. Normalerweise werden in der Massenspektrometrie nicht mehr als 10.000 Proben pro Tag analysiert, sofern ein kommerziell erhältliches Gerät verwendet wird. Diese Begrenzungen werden durch eine notwendige Kopplung der Massenspektrometrie an eine Form der Chromatographie, Desorption oder anderen Geräten zur Probenzuführung bedingt. Selbst für die Atmosphärendruck Massenspektrometrie gelten in etwa dieselben Werte, auch wenn nicht unter reduziertem Druck gearbeitet werden muss. [4]

Das Interesse an besonders schnellen und verlässlichen Messungen im Rahmen der TAS für spezielle Anwendungsbereiche ist somit groß. Daher entwickelte sich in den vergangenen Jahren die Forschung an Proben im 10^{-9} (*nano*)L bis 10^{-18} (*atto*)L Bereich rasant und wird als Mikrofluidik bezeichnet. [5] In der Mikrofluidik werden häufig miniaturisierte Chips verwendet,

welche von Kanälen durchzogen sind. Diese dienen nicht nur dem Stofftransport, sondern auch als Reaktionsgefäß zum Mischen oder Extrahieren und finden in der Spurenanalytik Anwendung. [6] Maßgeblich wurde das Mikrototalanalysesystem (μ TAS) von der Gruppe um Manz *et al.* [7] mitentwickelt. Seit etwa zehn Jahren gewinnt das „Lab-on-a-Chip“ stetig mehr Beachtung und entwickelt sich zu einem weit verbreiteten Instrument zur Probenhandhabung in der analytischen Chemie. [8] Dabei handelt es sich um kompakte Reaktoreinheiten bestehend z.B. aus Reservoir, Reaktionszelle und Detektorfeld auf einem kleinen Chip. Hauptsächlich werden diese Chips in Kombination mit spektroskopischen Methoden verwendet. Zudem existiert ein steigendes Interesse daran auch Massenspektrometer mit diesem Chip-basierten Systemen auszustatten. [9] Die häufigsten MS Techniken für diese Anwendung sind die electrospray ionization (ESI; 70 %) oder matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI; 28 %) als robuste Ionisationsmethoden, die auch unter Atmosphärendruck gut funktionieren. [10]

Aus dem Streben nach Miniaturisierung und dem Arbeiten mit kleinsten Probevolumina entstehen Probleme, welche eine Handhabung erschweren. In Relation zu den kleinen Probenmengen resultieren bereits kleinste absolute Verunreinigungen in hohen Konzentrationen. Zudem steigt bei abnehmendem Gesamtvolumen das Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis, so dass die räumliche Probengrenze, d.h. die Schnittstelle, an der Verunreinigungen in die Proben gelangen können, zunimmt. In mikrofluidischen μ TAS können Memory Effekte, d.h. Kreuzkontaminationen aus zuvor vermessenen Proben, problematisch sein und müssen umgangen werden, sofern die verwendeten Systeme mehrfach genutzt werden sollen. Durch aufwendige, zeit-/kostenintensive Spülungen und/oder Ausheizvorgänge (Hitzebeständigkeit vorausgesetzt) kann dieses Ziel erreicht werden. Neben Memory Effekten könnten auch das verarbeitete Material selbst und Produktionsrückstände zu chemischen Reaktionen oder chemischen Interferenzen während einer Messung führen. [11] Generell gilt und für Chip-basierte Techniken insbesondere, dass ungewollte Kontaminationen so gut wie möglich unterdrückt oder während den Messungen vermieden werden müssen. Um Memory Effekte zu vermeiden, können zusätzliche Reinigungsdurch-

läufe zwischen den Analysen durchgeführt werden. Diese sind vor allem wichtig, wenn eine andere Matrix oder ein anderer Analyt in den Fokus der Messungen rückt.

Nicht nur die Kontamination, sondern auch die Agglomeration an den Gefäßwänden kann zu Problemen führen. [12] Ein Verschluss eines mikrofluidischen Systems kann dazu führen, dass es nur schwer zu reinigen ist oder sogar unbrauchbar wird. Darüber hinaus wird es unter Umständen schwieriger auch bei teilweise verengten Kanälen die Fließparameter und das Mischungsverhalten zu bestimmen. Um diese Schwierigkeiten zu evaluieren, müssen eine Vielzahl an Testsystemen zur Charakterisierung der Fließeigenschaften angefertigt werden. Dies wiederum ist wenig kosteneffizient und benötigt zusätzliche Zeit für jeden neuen Prototypen. Aus diesen Gründen ist es notwendig Techniken zu entwickeln, die kleine Flüssigkeitsmengen handhaben und dabei ohne einen Kontakt zu Gefäßwänden auskommen. Zu diesem Zweck existieren bereits analytische Techniken, die auf fallenden Tropfen ohne Gefäßkontakt basieren, wie z.B. die laser induced liquid bead ion desorption mass spectrometry. [13] Als konsequente Fortführung dieser Idee wäre ein, sofern möglich, kompletter Verzicht auf Gefäße während der Lagerung, Handhabung und Analyse im Prozess sinnvoll.

1.2 Zielstellung

Die Ausführungen im vorangegangenen Abschnitt zeigen, dass eine Weiterentwicklung mikrofluidischer Systeme notwendig ist. Die intrinsischen Nachteile aus den Kontakten der Analytlösung mit den Gefäßen können durch eine Vermeidung dieser weitestgehend umgangen werden. Ein fallender Tropfen kann genau diesen Kontakt während der Analyse verhindern. Problematisch dabei ist, dass niemals der selbe Tropfen während einer Analyse bzw. mehrfach nacheinander über längere Zeitskalen beobachtet werden kann. Somit schließen sich Analysen wie z.B. reaktionskinetische Untersuchungen konsequent aus, oder können lediglich offline durchgeführt werden. Zusätzlich ist es nur eingeschränkt möglich eine Probenmanipulation, z.B. das Zufügen eines Reaktanten, während des Fallvorgangs durchführen zu können.

Mit der Anwendung von Levitationstechniken (lat. levitas = Leichtigkeit) in der analytischen Chemie ist es möglich kleinste Probevolumina stabil im Schwebezustand zu halten und mit analytischen Messgeräten zu koppeln. Häufig werden Flüssigkeiten im unteren μL -Bereich verwendet. Dies hat den Vorteil, dass Probleme bei der Handhabung von kleinen Probemengen im Reaktionsgefäß umgangen werden können. Gleichzeitig ist die Verweildauer eines Probevolumens hauptsächlich von der Messtechnik selbst abhängig. Bei Flüssigkeiten muss zudem deren Verdampfungsgeschwindigkeit berücksichtigt werden. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Levitationsmethoden, welche im folgenden Kapitel erläutert werden. Als besonders vielversprechende Technik wird die akustische Levitation für sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Levitationsexperimente genutzt. Diese stellt nur geringe Anforderungen an die zu untersuchende Probe und ermöglicht den Bau eines individualisierten Levitators. Somit lässt sich die akustische Levitation gemäß individueller Wünsche verwenden und eine Vielzahl unterschiedlicher Analysemethoden damit verbinden. Durch eine 360° Zugänglichkeit können z.B. spektroskopische und spektrometrische Analysen durchgeführt werden. Technische Entwicklungen eines bestehenden Systems sowie die Produktion von Einlass- und Injektionssystemen, Reflektoren und Charakterisierungen des Levitators und des Tropfens wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Diese Anpassungen sind grundlegend für die nachfolgenden am Tropfen angewandten analytischen Methoden.

In dieser Arbeit werden hauptsächlich massenspektrometrische Analysetechniken an akustisch levitierten Tropfen durchgeführt. Aufbauend auf den Erkenntnissen der von Stindt entwickelten CO_2 -Laser Desorption/Ionisation [14] wird die Desorption bei $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ Er:YAG eingeführt und diskutiert. Anstelle der bisher benutzten Matrix Glycerol bietet diese Desorptionstechnik die Möglichkeit Analysen aus wässrigen Lösungen durchzuführen. Dies wird durch die Anregung von OH-Streckschwingungen ermöglicht. Komplementäre Sonic Spray Ionisations Experimente sollen tiefere Einblicke in die Desorptions- und Verdampfungsprozesse am Tropfen während einer Laser Desorption geben. Die daraus gewonnenen Kenntnisse werden ge-

nutzt, um eine Methode ohne Lasereinsatz zu entwickeln. Diese basiert auf der Feld-induzierten Ionisation des Tropfens, die zur Erzeugung eines Sprays aus dem Tropfen verwendet wird, [15] welches massenspektrometrisch analysiert werden kann. Da nicht alle Analyten problemlos ionisiert und detektiert werden können, wird in einem separaten Kapitel auf die mögliche Implementierung weiterer Postionisationsmethoden eingegangen. Sie dienen darüber hinaus dazu die generell geringe Ionenausbeute bei Atmosphärendruck-Ionisationen zu erhöhen und so eine höhere Empfindlichkeit zu erhalten. Die dabei verwendeten Techniken sind die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck und hauptsächlich die dielektrisch gehinderte Entladungs-Ionisation.

Eine Nutzung der Whispering Gallery Mode im levitierten Tropfen ist eine vielversprechende Methode, um spektroskopische Analysen durchzuführen. Dabei wird die sphärische Form des Tropfens zum Vorteil ausgenutzt. Bei anderen Spektroskopie-Techniken kann der Kugellinsencharakter des Tropfens die Messergebnisse erheblich beeinflussen und zu unberücksichtigten Interferenzen führen.

Die Kenntnisse aus dieser Arbeit sollen dazu beitragen die akustische Levitation als universell einsetzbares Werkzeug, speziell für die Massenspektrometrie, einsetzbar zu machen. Die Kopplung mit verschiedenen Methoden demonstriert die vielseitige Anwendbarkeit (des levitierten Tropfens) und schafft gleichzeitig Anreize die Verbesserung dieser Methoden weiter voran zu treiben. Gerade in Hinblick auf ein μ TAS ist der levitierte Tropfen eine höchst interessante Möglichkeit die inhärenten Probleme bei mikrofluidischen Systemen zu umgehen. Zweckmäßig sind verwendete Einlasssysteme und Mischungsexperimente von großer Bedeutung für eine anwendungsorientierte Forschung am Levitator. Über die direkte Anwendbarkeit für analytische Fragestellungen hinaus sind die hier vorgestellten Messmethoden an levitierten Tropfen auch dafür geeignet physikalische Phänomene bei der Tröpfchenbildung aufzuklären. Beispielsweise ist eine Charakterisierung von Flüssigkeit/Gasphase-Grenzschichten, die in der Umwelt vorkommen (Oberflächen von Ozeanen, Wolken, etc.), von großer Bedeutung.

Kapitel 2

Methodische Grundlagen

2.1 Levitationsmethoden in der analytischen Chemie

Es gibt viele verschiedenartige Techniken kleine Proben im Schwebezustand halten zu können. Zur Herbeiführung der Levitation der Probe werden deren unterschiedlichen physikalisch/chemischen Eigenschaften ausgenutzt. [16, 17, 18] Einer der bekanntesten Vertreter dieser Levitationstechniken ist die aerodynamische Levitation. Diese erlaubt es Objekte in einem starken Gasstrom entgegen der Erdanziehungskraft im Schwebezustand zu halten, wie z.B. eine Flugsimulation im Windkanal. Zusätzlich muss bei der aerodynamischen Levitation, neben der, der Gravitation entgegen gerichteten Kraft, weiterer instrumenteller Aufwand betrieben werden, um das levitierte Objekt zu stabilisieren. Oft wird diese Levitationstechnik bei Beobachtungen zu Bildungsprozessen von Netzwerken erkaltender, geschmolzener Feststoffe genutzt. [19] Diese Methode hat den Vorteil, dass nahezu jedes Objekt levitiert werden kann. Jedoch ist dies immer einhergehend mit einem hohen Kostenaufwand für Gase bzw. Turbinen.

Optische Levitation wird durch Photonendruck mittels auf die zu levitierende Probe gerichteten und fokussierten Laser erzielt. Dementsprechend muss das Probenvolumen Photonen entweder reflektieren, streuen oder absorbieren. [20] Bei nicht-elastischer Streuung, sowie bei Absorption führt dies unweigerlich zu einer Erwärmung der Probe oder deren optischen Ausbleichen. Bei Verwendung dieser Technik sind zudem weitere methodische Schwierigkeiten zu beachten. Ein kohärenter Laserstrahl kann gegebenenfalls das Umfeld der levitierten Probe erhitzen, was zu kontinuierlich veränderten experimentellen Bedingungen führt. Diese wiederum führen zu instabilen Levitationsbedingungen und müssen, durch die Wahl eines nicht absorbierenden Umgebungsmedium oder einer Durchführung der Versuche im Vakuum, vermieden werden. Dadurch wird die Probenauswahl eingeschränkt. Für optimale Levitationsbedingungen muss der Brechungsindex des Objektes größer sein als der des umgebenden Gases, um Reflexionen oder Streuung zu minimieren. Das heißt, dass diese Methode für kleine Partikel bis zu einigen μm im Durchmesser geeignet ist und z.B. für das Einfangen und Analysieren von Nanopartikeln genutzt werden könnte. [21]

2.1 Levitationsmethoden in der analytischen Chemie

Magnetische und elektrostatische Levitationstechniken sind auf Objekte mit spezifischen Stoffeigenschaften begrenzt. Da die Levitation z.B. im magnetischen Feld stattfindet, müssen die Substanzen magnetisch sein. Somit kann diese Technik bei einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen keine Anwendung finden. Darüber hinaus ist diese Technik mit einem enormen Aufwand verbunden, um die Objekte im Schwebezustand zu stabilisieren. [22, 23, 24]

Neben den genannten verbreiteteren Levitationsmethoden existieren andere, seltener verwendete Techniken. Das von Johann Gottlob Leidenfrost beschriebene Phänomen der tanzenden Wassertropfen auf glühendem Metall ist eine bekannte Form der Levitation. [25] Es beschreibt die schnelle Verdampfung von Flüssigkeiten bei Kontakt mit sehr heißen Objekten. Dabei bildet sich eine dichte Gasschicht auf der die verbliebene Flüssigkeit des Tropfens gleiten kann. Dieser Effekt kann durch optimale Gestaltung der Platte (z.B. konkave Biegung) zur Levitation ausgenutzt werden. [26] Als eine sehr spezielle Alternative wurde im Jahr 2015 die Plasmalevitation eingeführt. [27] Hierbei hängt ein Tropfen an einer Elektrode, wobei die Gegenelektrode als Trägermaterial dient. So kann sich zwischen Tropfen und Träger ein Plasma ausbilden, sofern die Flüssigkeit elektrisch leitend ist. Die Expansionskräfte des Plasmas lassen den Tropfen schweben. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob es sich tatsächlich um eine Levitation handelt, da der Tropfen durch Adhäsion von der Elektrode zusätzlich gehalten wird und die Technik nicht kontaktlos ist.

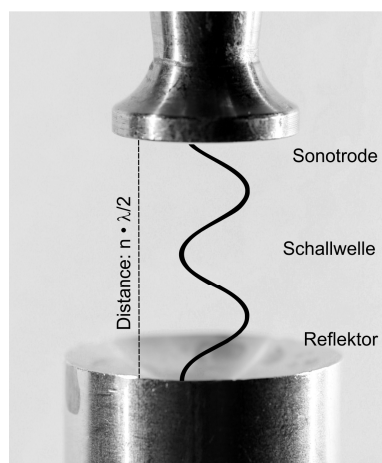
Als eine der erfolgversprechendsten und zugleich sehr flexiblen Methoden für die kontaktlose Probenhandhabung in der analytischen Chemie hat sich die akustische Levitation in den letzten Jahrzehnten herauskristallisiert. Deren Funktionsweise, Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten werden im folgenden Abschnitt 2.1.1 behandelt.

2.1.1 Akustische Levitation

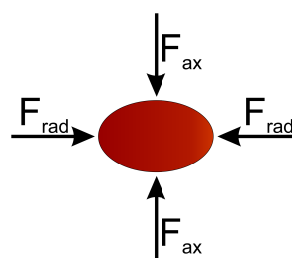
Vor etwa 150 Jahren wurden erste Beobachtung schwebender Partikel in akustischen Feldern im Rahmen analytischer Untersuchungen von A. Kundt publiziert. [28] Er beschreibt die Bildung von Staubfiguren in Orgelpfeifen. Dabei benutzte er dieses Phänomen, um spezifische Eigenschaften verschiedener Gase, wie z.B. deren Schallgeschwindigkeit durch den Vergleich der Abstände zwischen den schwebenden Partikeln, zu errechnen. Die akustische Levitation selbst hingegen wurde erstmals im Jahr 1933 von K. Müller und H. Bücks beschrieben. Sie profitierten von Kundts Entdeckungen und konnten so den ersten Levitator, bestehend aus einem Schallkonverter, einer Sonotrode und einem Reflektor, bauen. [29] Dieses Prinzip ist in Abb. 2.1a gezeigt. Durch die elektrische Schwingungsanregung eines Piezoelements werden hochfrequente Schwingungen erzeugt, die über eine Sonotrode abgegeben werden. Koaxial zur Sonotrode befindet sich der Reflektor, welcher die erzeugte akustische Welle zurücksendet und zusätzlich fokussiert. Zunächst beschrieben Bücks *et al.* den Prozess der Zerstäubung bei Kontakt einer Flüssigkeit mit dem Piezoelement. Darauf aufbauend zeigten sie, dass sich bei Reflektionen der Schallwellen Bereiche bilden, in denen sich Aerosolpartikel sammeln. Diese Bereiche werden Druckknoten genannt und entstehen bei resonanten Bedingungen des akustischen Resonators, dem Levitator.

Um die der Gravitation entgegen gerichteten Kräfte zu maximieren, muss der Reflektor entsprechend der Resonanzbedingung im Abstand zur Sonotrode von $n \frac{\lambda}{2}$ befestigt werden. Wobei n eine natürliche Zahl und λ die Wellenlänge der akustischen Welle ist. Die entstehenden Kräfte und deren Definitionen/Berechnungen wurden von Neidhart *et. al* ausführlich beschrieben. [30] Die auf den Tropfen wirkenden Kräfte können in eine axiale Kraft F_{ax} und in eine radiale Kraft F_{rad} unterteilt werden. Dabei entspricht das Kräfteverhältnis zwischen F_{ax} und F_{rad} etwa 5 : 1. Diese Kräfte führen je nach Reflektorposition und Tropfengröße zu einer linsenartigen Verformung des Tropfens. Grundsätzlich muss jedoch F_{ax} stärker sein als die Gravitationskraft, um eine Levitation zu ermöglichen. Gleichzeitig wirkt eine Rückstellkraft F_{rad} , welche einen

seitlichen Tropfenverlust verhindert (siehe Abb. 2.1 b). Anhand der Kräfte lässt sich anschließend die aufzubringende Energie bestimmen, welche gebraucht wird, um eine Probe levitieren zu können. In Abb. 2.2 a ist ein im Levitator stabil schwebender Tropfen gezeigt. Durch die



(a) Photo des akustischen Levitators mit schematischer Visualisierung der stehenden Schallwelle.



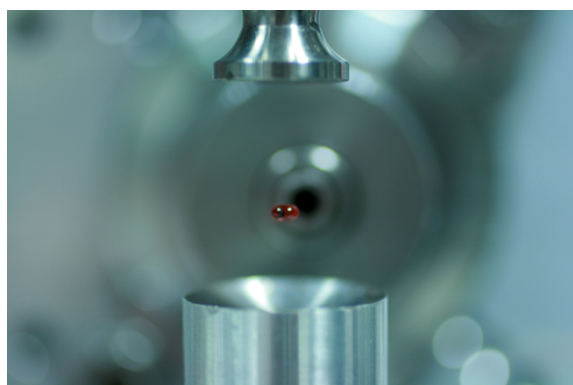
(b) Darstellung der auf den Tropfen wirkenden Kräfte im Levitator.

Abbildung 2.1: Prinzip der akustischen Levitation und Wirkung der Schallwelle auf den levitierten Tropfen.

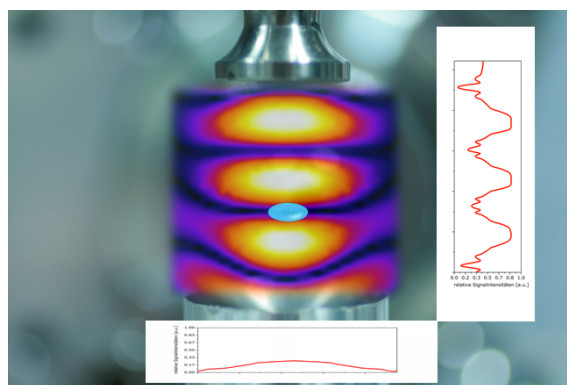
beschriebenen radialen und axialen Kräfte wird der Tropfen in dieser Position fixiert. Mit Hilfe von Schalldruckmessungen innerhalb des Schallfeldes im Levitator lassen sich die entstehenden Schalldruckmaxima und -minima visualisieren. [31] Die Ergebnisse einer solchen Messung sind in Abb. 2.2b gezeigt. Der Tropfen befindet sich in einem Druckminimum und wird durch die umgebenden Druckgradienten in axialer Position gehalten. Die auf den Tropfen einwirkenden radialen Kräfte sind, wie erwähnt, deutlich geringer und beruhen nicht ausschließlich auf einem Druckgradienten. Durch den Gasstrom an den Flanken des Tropfens entsteht ein Unterdruck durch den Bernoulli-Effekt und bewirkt, dass Kräfte horizontal auf den Tropfen wirken und ihn so radial stabilisieren. Zur gesamt aufzubringenden Energie, die zur Levitation von Proben genutzt wird, tragen somit kinetische und potentielle Komponenten bei. Die eigentlichen Kräfte entstehen somit erst, wenn sich ein Tropfen, bzw. Partikel oder Gas in der Falle befindet

worauf die Druckunterschiede wirken können.

Die in den Tropfen eingebrachte Energie, auch thermische Energie durch das Umgebungsmedium, führt zur Verdampfung flüssiger Proben. Speziell bei leicht flüchtigen Komponenten mit einem hohen Dampfdruck ist es wichtig dies zu berücksichtigen, da der Tropfen sehr schnell an Volumen verlieren kann. [32] Das ist besonders wichtig, wenn der Tropfen als Mikroreaktor genutzt werden soll. Gerade bei kleinen Volumina hat eine Konzentrationsänderung durch die Verdampfung von Lösungsmittel einen sehr starken Einfluss auf die Messergebnisse und muss entweder kontrolliert stattfinden oder, durch z.B. eine Anpassung der Umgebungsfeuchte [33] bzw. kontinuierlicher Zugabe von Lösungsmittel, kompensiert werden. [34] Alternativ kann der Einsatz von dünnen Schichten z.B. hydrophober Substanzen auf einem wässrigen Tropfen in Betracht kommen, um Verdampfungsprozesse zu verlangsamen oder zu unterbinden. [35]



(a) Levitation eines $6\ \mu\text{L}$ großen Rhodamin B Tropfens.



(b) Visualisierung des Schallfeldes (weiß: hoher Druck; schwarz: niedriger Druck) inklusive orts aufgelöster relativer Schalldruckintensität.

Abbildung 2.2: Aufbau des Levitators vor dem Einlass in das verwendete Massenspektrometer.

In den letzten Jahrzehnten sind unterschiedlichste Anwendungsmöglichkeiten der akustischen Levitation entwickelt worden. [36, 37, 38, 18, 39] Es zeigt, dass diese Levitationstechnik von einem großen Interesse und stetig wachsender Bedeutung für die analytische Chemie, gerade in Hinsicht auf die kontaktlose Probenhandhabung, ist. Speziell die akustische Levitation bietet die Vorteile, dass problemlos eine für analytische Anwendungen, wie z.B. die in die-

ser Arbeit genutzte Massenspektrometrie, individuelle Konstruktionen realisiert werden kann. In den meisten analytischen Anwendungen wird das Levitationssystem genutzt, um mit Hilfe schwebender, flüssiger Tropfen natürliche oder anthropogene gas/flüssig-Aerosole nachzuempfinden. [40] Sie können ebenso als kontaktlose Reaktionsgefäße in z.B. der Zellbiologie oder zur Charakterisierung von chemischen und physikalischen Zuständen dienen. [41, 42, 43] Darüber hinaus ist es möglich ein online Monitoring an den levitierten Objekten durchzuführen. [44] Als häufig verwendete Technik wird die Massenspektrometrie im Folgenden eingeführt.

2.2 Massenspektrometrie

Grundlagen für die heutige Massenspektrometrie wurden bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts gelegt. [45, 46] Diese beschreiben die Trennung von Ionen gemäß ihres zunächst noch Ladung-zu-Masse, bzw. später dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und die Möglichkeit mittels eines geeigneten Detektors ein Spektrum zu erhalten. Auf diesen Experimenten beruht die grobe Einteilung der massenspektrometrischen Analyse in drei Teile: Ionisation, Massenselektion und Detektion.

Die Ionisationsmethoden lassen sich z.B. grob in Ionisation bei vermindertem Druck oder Atmosphärendruck-Ionisation unterteilen. Eine detailliertere Auflistung kann erhalten werden, sofern die Methoden den physikalisch-chemischen Ionisationsverfahren entsprechend sortiert sind. Elektronenstoßmethoden: Chemische Ionisation (CI), Elektronenstoß Ionisation (EI). Teilchenbeschussmethoden: Fast Atom Bombardment (FAB), Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS). Feldionisationsmethoden: Fieldionisation (FI), Felddesorption (FD). Sprühmethoden: Elektrospray-Ionisation (ESI) [47], Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) [48]. Photoionisationsmethoden: Single Photon Ionization (SPI), Matrix-unterstützten Laser Desorption/ Ionisation (MALDI) [49]. Plasma basierte Ionisation und Thermische Ionisation (TI).

Der auf eine Ionisation folgende Schritt ist die Trennung der Ionen gemäß ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Zu diesem Zweck gibt es auch unterschiedliche Analysatoren wie Sek-

torfelder oder Ionenfallen, welche die m/z Werte scannen. Im Folgenden wird hingegen ausschließlich an Flugzeitmassenspektrometern (engl. Time-of-Flight, ToF) gearbeitet. Diese werden verwendet, da sie in einer Messung den gesamten Massenbereich aufnehmen können. Das Prinzip des ToF-Analysators geht auf die Arbeit von Stephens *et al.* zurück. [50] Dieser hat das Flugverhalten von geladenen Teilchen in einer feldfreien Zone nach einem Impuls ausgenutzt, um sie gemäß ihrem m/z -Verhältnis zu separieren. Das Verhältnis kann folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eUt^2}{s^2} \quad (2.1)$$

mit der Elementarladung e , Beschleunigungsspannung U , Flugzeit t und der Flugstrecke s des Massenspektrometers.

Demnach kann, wenn die Flugzeit eines Ions samt aller Geräteparameter bekannt ist, daraus der m/z -Wert errechnet werden. Durch die Verlängerung der Flugstrecke wird eine bessere Trennung der Ionen und somit eine Erhöhung der Auflösung erreicht. Die Flugstrecke muss jedoch nicht linear verlaufen, sondern kann durch Ionenoptiken umgelenkt werden und eine V- oder W-Form beschreiben, wodurch das Massenspektrometer weniger Raum benötigt. Diese Optiken werden Reflektron genannt und entscheidend von Mamyrin mit entworfen. [51] Sie verlängern nicht nur die Flugstrecke, sondern können zusätzlich die Flugzeit präzisieren, da die Ionen unterschiedlich tief (gemäß Masse und Ladung) in das Reflektron eintauchen und refokussiert werden. Dabei werden Unterschiede der initialen Beschleunigung kompensiert. Neben der Flugstrecke selbst kann auch die Beschleunigung entweder linear oder orthogonal erfolgen. Bei der orthogonalen Beschleunigung werden aus einem fokussierten Ionenstrahl heraus die Ionen orthogonal in die feldfreie Flugstrecke extrahiert. [52] Der Hauptvorteil dieser Methode liegt darin, dass die Ortsunschärfe zu Beginn der Beschleunigung durch die vorangegangene Fokussierung minimiert wird und die Impulsunschärfe quasi null ist (orthogonal zur Flugrichtung). Ein weiterer Vorteil der ToF-MS ist, dass aus dem Ionenstrahl in kürzester Zeit sehr viele

Spektren aufgenommen werden können. Dies kommt durch das gepulste Abfragen zustande und resultiert aufgrund der kurzen Flugzeit einzelner Ionenpakete in einem zweistelligen KHz-Bereich. Durch eine Mittelung der erhaltenen Spektren kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert werden.

Der wohl bekannteste Vertreter unter den Detektoren, der gleichzeitig auch die einfachste Möglichkeit der Detektion bietet, ist der Faraday-Detektor (engl. Faraday Cup, FC). Dieser registriert den entstehenden Strom, welcher durch das Auftreffen der Ionen auf dessen Oberfläche entsteht und mittels Verstärker und Diskriminatoren ausgewertet werden kann. Als eine Weiterentwicklung wird heutzutage oftmals ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verbaut, um eine Signalverstärkung zu erreichen. Dies geschieht durch Dynoden, d.h. ein Ion trifft auf eine Dynode und schlägt Elektronen aus dem Dynodenmaterial heraus. Die herausgeschlagenen Elektronen wiederum treffen auf eine weitere Dynode, schlagen erneut mehrere Elektronen heraus und so weiter bis ein verstärkter Strom (oft um den Faktor 1.000) gemessen werden kann. Das Auslesen erfolgt mittels Analog-Digital-Wandler. Der SEV kann unterschiedliche Gestalten haben, z.B. die klassische Röhrenform (PMT von engl. photomultiplier tube), in der die Dynoden kaskadenförmig übereinander liegen. In einer gebogenen Anordnung ist der SEV als Channeltron bekannt. Befinden sich viele kleine solcher Kanäle auf einer Platte, wird dies als Microchannel Plate (MCP) bezeichnet. Zusätzlich kann ein Phosphorschirm hinter der MCP befestigt werden. Das durch den Elektronen-Beschuss entstehende Phosphoreszenzmuster kann mittels eines *charge-coupled device* (CCD)-Detektors ausgelesen und ausgewertet werden. Dieser elektro-optische Multikanal-Detektor trägt zur Verbesserung der Empfindlichkeit bei.

In Hinblick auf die μ TAS Anwendung der Massenspektrometrie ist es nötig eine Kombination aus Ionisationsart, Analysator und Detektor zu wählen, welche eine schnelle Abfrage der Informationen aus einem Probevolumen ermöglicht. Somit ist die Detektion mittels einer MCP sinnvoll, um eine geeignete schnelle Abfrage eines kompletten Spektrums bei einem gu-

ten Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die Verwendung eines orthogonal beschleunigten ToF-Analysators bietet den Vorteil einer hochfrequenten Extraktion aus dem Ionenstrahl, wodurch die Genauigkeit der Messungen positiv beeinflusst wird. Die Diversität an Ionisationsmethoden ermöglicht es problemorientiert eine spezifische Methode auszuwählen und eine massenspektrometrische Analyse durchzuführen. Die Bedingungen der Probenzufuhr sind ebenfalls von essenzieller Bedeutung, z.B. aus welchem Aggregatzustand eine Ionisation erfolgen soll, um zu entscheiden welche Ionisationstechnik angewendet wird. Da die Kopplung eines akustisch levitierten Tropfens bisher nur sehr eingeschränkt genutzt werden konnte, werden im folgenden Abschnitt die zwei gängigen Entwicklungen auf diesem Gebiet genauer erläutert.

2.2.1 Akustische Levitation in der Massenspektrometrie

Im Gegensatz zur Spektroskopie am levitierten Tropfen wurden bisher nur eine sehr geringe Anzahl an Publikationen verfasst, die eine Kopplung eines levitierten Objektes an ein Massenspektrometer beschreiben. Die erste Publikation zu solch einer Kopplung ist aus dem Jahr 2008 von der Gruppe um Smith [53] geschrieben worden. Darin beschreiben sie kurz die akustische Levitation und die Überführung von Material aus dem Tropfen in ein Massenspektrometer bei Atmosphärendruck. Zu diesem Zweck verwendeten sie eine Laserdesorptionstechnik bei einer Wellenlänge von 337 nm (Stickstofflaser) und dem Absorptionsmedium α -Cyano-4-hydroxymizsäure. Ihre entwickelte Methode wird „charge and matrix-assisted laser desorption/ionization“ genannt. Die ladungsunterstützte Desorption gliedert sich in drei aufeinanderfolgende Prozesse: *i.* Der Tropfen wird durch eine Coronaentladung aufgeladen, so dass eine Nettoladung auf diesen übertragen wird. Dabei wird dieser durch Ringelektroden stabilisiert, da er sonst beginnen würde zu oszillieren und evtl. der Messung entzogen würde. Bei Phase *ii.* wird gewartet bis der Tropfen in Ruhelage ist, um in Phase *iii.* eine Laserdesorption durchführen zu können. Durch die Anordnung der Ringelektroden, welche die Zugänglichkeit des Levitators erheblich beeinträchtigen, sowie der Wahl einer geeigneten angelegten Spannung werden die

2.3 Spektroskopische Methoden am levitierten Tropfen

geladenen, desorbierten Tropfen entsprechend eines abfallenden Spannungsgradienten in Richtung Massenspektrometereinlass geleitet. Die spezielle MALDI-Matrix dient bei dieser Technik hauptsächlich als Chromophor.

Darauf aufbauend wurde von Stindt *et al.* [14] fünf Jahre später eine auf der CO_2 -Laser-desorption basierende Technik entwickelt. Da auch bei dieser Technik ein laserabsorbierendes Medium im levitierten Tropfen notwendig ist, wurde Glycerin als Matrix für die Testsubstanz verwendet. Vergleichbar ist diese Durchführung mit einem IR-MALDI-Experiment. Durch den Einsatz von Glycerin als Lösungsmittel kann auf zusätzliche Chromophore verzichtet werden, um chemische Interferenzen möglichst zu vermeiden. Auf die Ringelektroden wurde bei dieser Variante der Laserdesorption gänzlich verzichtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der Elektroden mit einem zusätzlichen instrumentellen Aufwand verbunden, aber nicht zwingend notwendig ist. Neben den Elektroden wurde auf die, der Desorption vorgeschaltete, Ladung des Tropfens verzichtet. Stindt zeigte so, dass mittels der Laserdesorption eine Ionisation erzielt werden kann und die gebildeten Ionen im entstehenden Aerosol lediglich durch den vorherrschenden Druckgradienten in das Massenspektrometer überführt werden können. Durch die Optimierung der Matrixzusammensetzung wurde zusätzlich eine Reduktion von Alkaliaddukten erzielt, um gezielter Analytmoleküle zu protonieren.

2.3 Spektroskopische Methoden am levitierten Tropfen

Damit die Auswirkungen sich verändernder chemischer oder physikalischer Eigenschaften des Tropfens (z.B. durch Verdampfungsprozesse oder chemischer Reaktionen) während einer Messung am Tropfen minimiert werden können, muss die Abfragung der Parameter möglichst schnell geschehen. Aus diesem Grunde werden spektroskopische Studien bisher häufig an akustisch levitierten Proben durchgeführt. Dazu zählen z.B. Röntgenstreuungsexperimente von anorganischen Kristallisationsprozessen [54] oder Proteinkristallisation und -agglomeration, [55,

56] aber auch UV/Vis- und Raman-Experimente an kleinen Molekülen sowie die Bildung von Nanopartikeln. [34] Neben kinetischen Betrachtungen enzymatischer Reaktionen [57] können zusätzliche Untersuchungen unter Berücksichtigung der Umgebungsfeuchte (z.B. mit ionischen Flüssigkeiten) durchgeführt werden. [58] Im Rahmen des so genannten Lab-on-a-Drop kann auch ein Tropfen als Mikroreaktor genutzt werden. [59]

Kapitel 3

Anpassung der verwendeten Geräte

3.1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von Geräten verwendet, die teilweise für einen wissenschaftlichen Einsatz zweckentfremdet oder zumindest in anderen Zusammenhängen genutzt wurden und somit von ihrer vom Hersteller gegebenen Anwendung abweichen. In solchen Fällen, aber auch beispielsweise bei einer Kopplung zweier individuell bezogenen Geräte, waren oftmals Modifikation und Optimierungen der Einzelkomponenten nötig, die in diesem Kapitel aufgeführt werden.

Bei dem benutzten Flugzeitmassenspektrometer handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Gerät, das für eine Ionisationstechnik bei Atmosphärendruck (APCI) entwickelt wurde. Im Gegensatz zu vielen anderen MS-Instrumenten kann die am MS angebrachte APCI-Quelle ohne Schwierigkeiten demontiert und durch andere Ionenquellen ersetzt werden. Dies bedeutet, dass Sprayionisationsexperimente an diesem MS durchgeführt werden können und eine Ionen-
transmission, nach Einstellung der Quadrupolparameter, in Richtung Flugstrecke gewährleistet ist. Die einzelnen, selbst entwickelten Ionisationstechniken werden in den folgenden Kapiteln 4.4, 5.5, 6.4 behandelt. Dennoch bedarf es einer vorherigen Anpassung des Einlasses, um eine möglichst hohe Ionenausbeute zu erhalten. Da sämtliche Ionisationsarten unter Atmosphärendruck stattfinden, treten nach dem eigentlichen Ionisationsprozess eine Vielzahl an Stößen mit anderen Molekülen der Umgebung auf. So wird die effektive Ionenausbeute bereits drastisch gemindert. Durch einen möglichst großen Transfer in das MS kann so die Nachweisempfindlichkeit der Methode deutlich erhöht werden. Das Schallfeld des Levitators wird hier durch eine geometrische Optimierung des Reflektors hinsichtlich der Levitationseigenschaften verbessert. Zudem soll eine zum Schallfeld koaxiale Tropfeninjektion genutzt werden, um eine Automatisierung bei möglichst wenig Platzverbrauch zu ermöglichen. Eine derartige Automatisierung ist notwendig, sofern die akustische Levitation zukünftig im Rahmen von μ TAS-Anwendungen eingesetzt werden soll.

3.2 Reflektor und Schallfeld

Ein von Stindt *et al.* geschriebenes Programm erlaubt die Berechnung und Visualisierung von Schallfeldern im Levitator. [31] Dabei werden sowohl Schallschnelle als auch der Schalldruck berücksichtigt; nähere Angaben zum Algorithmus sind der genannten Quelle zu entnehmen. Für die Anfertigung eines Reflektors und einer Sonotrode sind die mit diesem Programm erhaltenen Daten interessant, da so eine empirische Annäherung an das Optimum entfällt, wodurch Kosten und Zeit gespart werden. In Abb. 3.1 ist ein mit diesem Algorithmus berechnetes Schallfeld ($r_{(\varnothing Ref.)} = 20 \text{ mm}$; $r_{(\varnothing Sono.Ende)} = 17 \text{ mm}$) dargestellt. Näherungsweise wird angenommen, dass die Schallwelle 20 mal reflektiert wird.

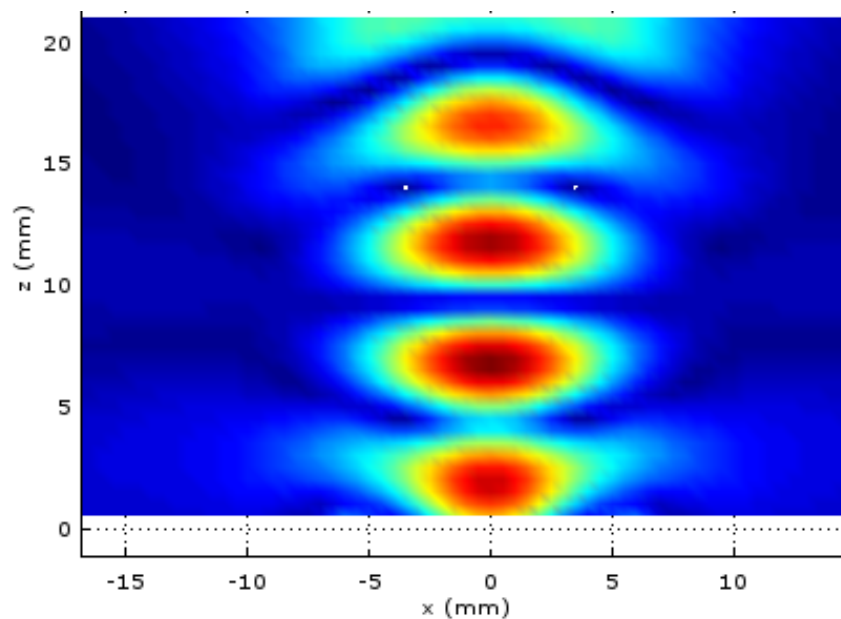


Abbildung 3.1: Abbildung der durch Berechnung erhaltenen Schallfeldsimulation (rot: hoher Schalldruck, blau: niedriger Schalldruck).

Die blauen Bereiche repräsentieren einen minimalen und die in rot dargestellten Bereiche einen maximalen Schalldruck. Die Schalldruckminima innerhalb des Levitators sind deutlich hervorgehoben und sind das Kompartiment, in dem Partikel und Tropfen stabil levitiert werden

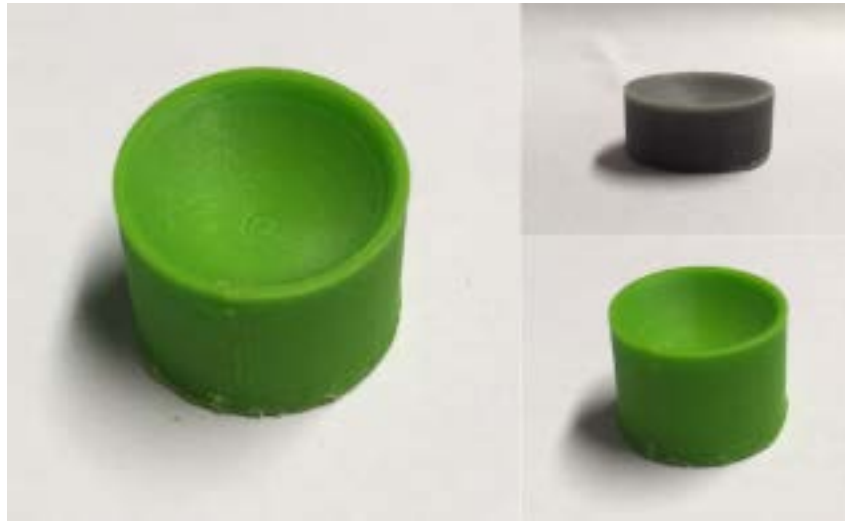


Abbildung 3.2: Reflektoren, welche mit Hilfe eines 3D-Druckers produziert wurden.

können. Die dafür verantwortlichen Grundlagen wurden bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben. Aus den Erkenntnissen der Arbeit von Stindt [31] geht hervor, dass besonders die Form des Reflektors wichtig ist für eine effiziente Umwandlung der Schwingungen in eine auf den Tropfen wirkende Kraft. Sofern der Reflektor zu klein ist, geht beispielsweise Energie aus diesem System verloren und eine stabile Levitation wäre nicht möglich oder zumindest erschwert. Die Krümmung des Reflektors ist zudem für die Fokussierung des Schallfeldes verantwortlich und hat so einen ebenfalls nicht zu vernachlässigenden Anteil an den Levitationseigenschaften. Die Produktion der Reflektoren kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Bisher wurde ein aus Edelstahl gefertigter Reflektor für die Levitationsexperimente verwendet. Dieser ist in einer hauseigenen Werkstatt gemäß den Berechnungen hergestellt worden.

Mit Hilfe der 3D-Druck Technologie sind zukünftig schnellere Anpassungen möglich. Das Polymermaterial ist leicht zu bearbeiten und durch einfache Bearbeitung einer CAD-Datei können simultan mehrere Reflektoren unterschiedlicher Geometrie hergestellt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass nach dem Druck die Oberfläche des Reflektors poliert wird, um Unebenheiten, welche normalerweise bei diesem Prozess entstehen, auszugleichen. Sie führen zu un-

regelmäßigen Reflektionen in unerwünschte Richtungen. Dies erniedrigt die Qualität des akustischen Resonators. Einige beispielhafte Prototypen dieser 3D-gedruckten Reflektoren sind in Abb. 3.2 gezeigt.

Durch eine Gießmethode kann dieses Problem umgangen werden. Hong *et al.* haben eine Methode entwickelt, welche als Reflektor u.a. flüssige Substanzen nutzt. Dies hat zur Folge, dass die Oberfläche sich dem Schallfeld anpasst und selbstständig eine Krümmung ausbildet. [60] Dadurch kann eine sehr glatte Oberfläche des Reflektors entstehen, welche optimal für jedwede gewählten Parameter des Levitators ausgebildet werden. Für Experimente in der vorliegenden Arbeit wurde diese Idee aufgegriffen und zur Herstellung von Reflektoren genutzt. Wird diese Flüssigkeit durch ein frisch angerührtes Harz ausgetauscht, erstarrt die Flüssigkeit nach einiger Zeit. Der so gegossene selbst geformte (im Sinne des englischen Begriffes des „self assembly“) Reflektor besitzt Vorteile, welche für die Anwendungen von großem Interesse sind. Dadurch, dass sich die Krümmung des Reflektors automatisch anpasst, ist davon auszugehen, dass sich ein optimaler Radius für eine maximale Qualität des Resonators ausbildet. Das bedeutet eine Maximierung der auf den Tropfen einwirkenden Kräfte. Eine Levitation sollte so stabiler sein. Er kann beispielsweise in verschiedenen Größen für verschiedene Halterungen angefertigt und so vielfältig eingesetzt werden. Durch das leicht zu bearbeitende Material kann zusätzlich ein Kanal mit eingegossen werden, der eine Kombination mit Injektionssystemen erlaubt.

3.3 Tropfeninjektion und Mischungsverhalten

Injektion Tropfen können auf unterschiedlichen Wegen in den Levitator eingebracht werden. Der am häufigsten genutzte und gleichzeitig mit wenig Aufwand verbundene Weg ist die direkte Injektion aus einer Pipette in den Druckknoten. Dieser Vorgang bedarf ein wenig Übung und Geschick, ist aber durchaus angebracht für kurzfristige und selten wiederholte Experimente. Für Experimente, die aus statistischen Gründen häufig wiederholt werden müssen oder Monitoring Experimente, wie auch die Anwendung in μ TAS, bietet sich eine automatisierte Tropfeninjek-

tion an.



Abbildung 3.3: Darstellung eines gegossenen Reflektors mit eingearbeitetem Injektionssystem.

Bei einer automatischen Injektion von Tropfen in einen Druckknoten des Levitators sind zwei grundsätzlich verschiedene Techniken nutzbar: ballistische oder direkte Injektion. Durch den Beschuss mit Tropfen können ebendiese in das akustische Feld eingebracht werden. Sofern die kinetische Energie nicht zu groß ist und der Tropfen das akustische Feld nicht komplett durchquert, wird er im Druckknoten arretiert. Die vom Tropfen beschriebenen Trajektorien wurden von der Gruppe um Nielsson in einer Veröffentlichung abgebildet. Die Methode findet bei spektroskopischen Untersuchungen bereits Anwendung. [61, 34] Sie ist bislang jedoch hauptsächlich im Einsatz, um Flüssigkeitsmengen dem bereits levitierten Tropfen zuzugeben. Das erstmalige Einbringen von Flüssigkeitsmengen durch ballistische Injektion ist aufgrund der räumlich, symmetrischen Potentialminima nicht möglich. Diese Symmetrie würde dazu führen, dass ein Tropfen, der die Barriere überwinden kann, um in das Minimum zu gelangen, automatisch den nötigen Impuls aufweisen würde das Minimum kinetisch auch wieder zu verlassen.

3.3 Tropfeninjektion und Mischungsverhalten

Bei der direkten Injektion in den Druckknoten kann z.B. eine Mikroliterpipette in eine Halterung eingespannt und auf Knopfdruck eine bestimmte Menge an Flüssigkeit injizieren werden. Diese Methode ist zwar einfach, bietet aber nur ein begrenztes Injektionsvolumen, den Pipetten entsprechend. Um eine kontinuierliche Injektion zu ermöglichen, ist ein Injizieren via eines Schlauchsystems vorteilhaft. Dieses könnte an eine Kapillarelektrophorese gekoppelt werden, aus einem Produktionsprozess kleine Mengen ableiten oder in einem vorgeschalteten mikrofluidischen Systemen einer Reaktion induziert werden. Diese Kombination aus Schlauchsystemen hat einen entscheidenden Nachteil: Ein bestimmter Abschnitt des seitlichen Zugangs zum Levitator ist permanent verbaut. Durch eine zum akustischen Resonator koaxiale Anordnung (vgl. Abb. 3.3) des Injektionssystems kann der Tropfen auf seiner kompletten äquatorialen Achse zugänglich gemacht werden. Dies ist besonders bei optischen Spektralanalysen von großem Interesse, da der freie Raumwinkel, über den das detektierte Licht integriert aufgenommen wird, nicht beschränkt ist.

Bei der koaxialen Positionierung ist es besonders wichtig darauf zu achten, wo sich der Auslass des Systems befindet. Durch die unterschiedlichen Druckkompartimente im Resonator, kann Flüssigkeit einen Gegendruck erfahren. Damit die Flüssigkeit jedoch in den Druckknoten hineingezogen wird, muss sich der Ausgang, z.B. einer Kanüle, welche an das Pumpsystem angeschlossen ist, unmittelbar neben einem Druckmaximum befinden. Der zu injizierende Tropfen folgt dem Druckgradienten in den Knoten und levitiert stabil. Wichtig ist, dass ein angeschrägter Ausgang, wie er beispielsweise bei Spritzenkanülen üblich ist, sich auf der Seite des abfallenden Gradienten befindet. So wird der Tropfen von der Kanüle weg und nicht an den Kanülenschaft geleitet. Zur besseren Justierung kann ein Kanülenende flach abgeschliffen werden. Je nach Experiment ist es wichtig die etwaige elektrische Leitfähigkeit des Injektionssystems zu beachten.

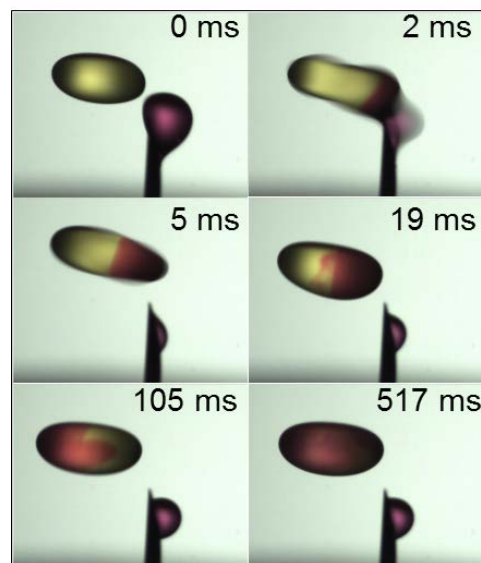


Abbildung 3.4: Tropfeninjektion sowie eine chronologische Beobachtung des Mischungsverhaltens.

Mischung Die zur Levitation notwendigen Kräfte wirken ausschließlich auf die Flüssigkeitsoberfläche des levitierten Tropfens. Turbulente Kräfte, wie Konvektion, treten daher in μL großen Tropfen nicht stark ausgeprägt auf. Eine Durchmischung innerhalb des Tropfens findet somit eher durch Diffusion statt und erfolgt auf der für diffusionskontrollierte Prozesse typischen Zeitskala von einigen Sekunden. Daher ist bei der Injektion eines bereits homogenen Tropfens die Durchmischung der Flüssigkeit im Levitator redundant. Sobald sich hingegen ein Zweiphasensystem entweder bereits im Tropfen befindet, durch das Mischen zweier Stoffe, oder als Reaktionsprodukte entsteht, ist es sehr wichtig diese Prozesse zu verstehen und in jeweilige Betrachtungen mit einzubeziehen. Beobachtungen mehrphasiger Systeme in levitierten Tropfen und deren Evaporationseigenschaften wurden bereits anderswo beschrieben. [62, 63] Abb. 3.4 zeigt, dass es auch bei später homogenen Gemischen einige Zeit bis zur vollständigen Durchmischung dauert. Dies ist besonders bei Versuchen zur Reaktionskinetik zu berücksichtigen.

Mit Hilfe von Frequenzmodellierungen der Amplitude der Ultraschallträgerfrequenz können die Obertöne der Tropfenoberfläche angeregt werden, welche zu einer harmonischen Oszillation des Tropfens führen. [64] Durch die folgende Formel wird der entsprechende Oberton n

berechnet,

$$f_n = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{n(n-1)(n+2)\gamma}{pR^3}} \quad (3.1)$$

wobei p die Dichte, γ die Oberflächenspannung und R der Tropfenradius sind.

Vor allem die niedrigeren resonanten Schwingungen führen zu einer effizienten Durchmischung des Tropfens. Der Vorgang der schwingungsinduzierten Mischung ist in Abb. 3.5 dargestellt. Diese Technik kann verwendet werden, um gezielt nach einer Tropfenzugabe eine Homogenisierung herbeizuführen. Als Bestandteil eines Injektionsprogrammes soll dieser Schritt helfen die Reproduzierbarkeit von Versuchen zu erhöhen. Die Stabilität der Levitation selbst ist durch diese Art der Mischung nicht beeinträchtigt.

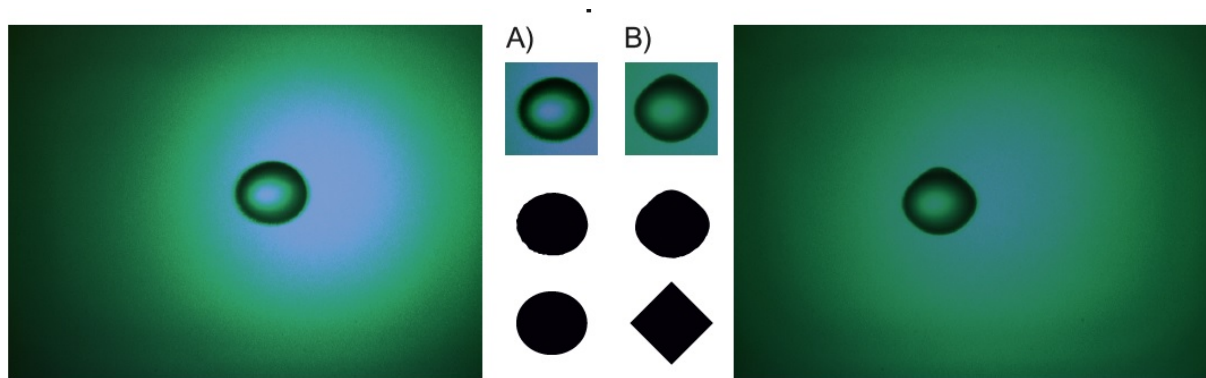
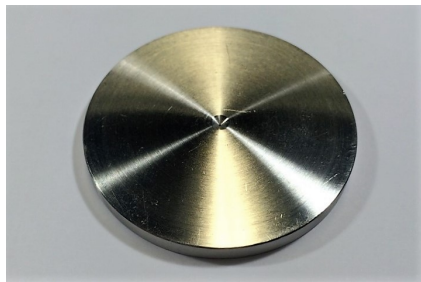


Abbildung 3.5: Schallfrequenz-induzierte Tropfenverformung.

3.4 Massenspektrometereinlass

Die Überführung von Substanz aus dem Tropfen erfolgt grundsätzlich entlang eines fallenden Druckgradienten in Richtung Massenspektrometer. Es entsteht somit ein Sog, der Gas, Partikel und Tropfen in das Massenspektrometer hinein leitet. Es ist also von enormer Bedeutung eine gute Transmission in die erste Pumpstufe des Massenspektrometers zu realisieren. Dort befindet sich ein ionenleitendes Quadrupol, welches auf die Atmosphärendruck-Kopplung optimiert ist und die weitere Transmission in die folgenden Pumpstufen gewährleistet. Gelangen



(a) Platteneinlass (Innenseite).



(b) Platteneinlass (Außenseite), Bohrung von $300\ \mu\text{m}$

Abbildung 3.6: Darstellung des Einlasses, welcher genutzt wird, wenn die mitgelieferte APCI Quelle eingesetzt wird.

die Ionen, welche außerhalb dieser ersten Stufe gebildet werden, in den Akzeptanzbereich dieses Quadrupol-Ionenguides, so ist somit auch eine weitere effiziente Überführung der Ionen bis zum Detektor gegeben. Für die unterschiedlichen in dieser Arbeit vorgestellten Ionenquellen muss daher der Einlass in die erste Pumpstufe optimiert werden. Gleichzeitig bedeutet dies, es ist notwendig für genutzte Ionisationsmethoden geeignete Einlässe in das MS zu nutzen. Im Folgenden werden die drei meistgenutzten Einlässe vorgestellt, welche Anwendung in den unterschiedlichen Ionisationsmethoden finden. Grundsätzlich sind sie teilweise oder gänzlich aus Metall verarbeitet, damit auf die Einlässe ein Potential gelegt oder sie potentialfrei gehalten werden können.

Platteneinlass

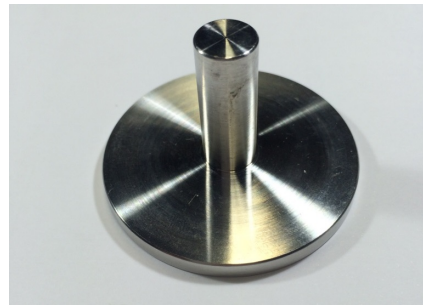
Wird eine aufwendige Halterung der Ionenquelle vor das Flugzeitmassenspektrometer angebracht, kann ein Platteneinlass (s. Abb. 3.6) genutzt werden. Dessen Einlassöffnung hat einen Durchmesser von $300\ \mu\text{m}$ und läuft innerseitig konisch auseinander. Sofern eine APCI eingesetzt wird, befindet sich die Coronanadel knapp vor dem Einlass, so dass die gebildeten Ionen möglichst effizient überführt werden können. In Kapitel 7.1 z.B. sind Techniken beschrieben, bei denen sich die Ionisationsquellen in zylindrischen Teflon Werkstücken befinden. Diese kön-

nen ohne Probleme an diesen Platteneinlass angebracht werden. Vorteilhaft dabei ist, dass diese Quellen sich durch den entstehenden Unterdruck eigenständig ansaugen und nur eine lockere Fixierung beim Aufbau des Experimentes nötig ist.

Hervorstehender Einlass



(a) Hervorstehender Einlass (Rückseite).



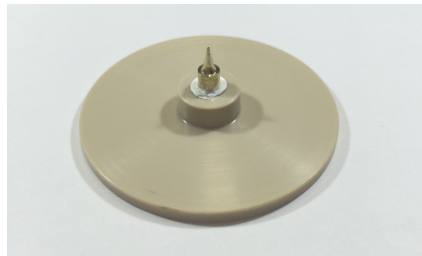
(b) Hervorstehender Einlass (Vorderseite).

Abbildung 3.7: Einlass für entferntere Ionisationsregionen.

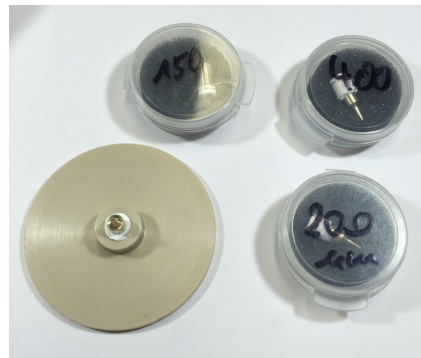
Findet die Ionisation weiter entfernt statt, kann ein zylindrisch hervorstehender Einlass (s. Abb. 3.7) verwendet werden. Dieser ist in der Regel potentialfrei und hat eine Öffnung, die der von Einlass 1 entspricht. Die Details für diesen Einlasstyp sind in der Veröffentlichung von Shelley *et al.* aufgeführt. [65] Grundsätzlich hat dieser Einlass den Vorteil, dass durch die längere Verweildauer des Tropfens in der Einlassregion auch größere Tropfen einer Sprayionisation genügend Zeit zum Desolvatisieren haben. Auch wäre es möglich diesen Einlass mit Hilfe eines Heizwiderstandes zu erwärmen, wodurch der Desolvatationsprozess beschleunigt wird.

Konischer Einlass

Für den eigentlichen metallisch, konischen Einlass (s. Abb. 3.8) wurde eine Fassung aus Polyetheretherketon (PEEK) angefertigt. Dieses hat den Vorteil, dass es sehr formstabil ist und eine sehr gute Stabilität gegenüber hohen Temperaturen (Smp.: 335 °C), sowie vielen anorganischen



(a) Konischer Einlass auf PEEK-Befestigung.



(b) Unterschiedlich anzubringende Einlässe auf PEEK Unterlage.

Abbildung 3.8: Für Ionisationstechniken mit erhöhter Spannung ist ein elektrisch isoliertes PEEK-System mit separatem Einlass dargestellt.

und organischen Verbindungen aufweist. Als Einlass wird ein konisch zulaufender Aufsatz verwendet, den man in die Halterung einbringen kann und mit Polytetrafluorethylen (PTFE) abgedichtet wird. Durch den im Massenspektrometer vorherrschenden Unterdruck zieht sich der Einlass fest. Er hat ähnliche Eigenschaften wie ein herkömmlicher Skimmer, jedoch hilft die längliche Form deutlich bei der Fokussierung des gebildeten Ionenstrahls. Dieser Effekt wurde bereits von Krutchinsky *et al.* beschrieben. [66] Die längere Form läuft spitz zu, was vorteilhaft ist, sofern ein breiter Einlass z.B. die Levitation durch Rückreflektionen von Schallwellen destabilisiert. Durch das Anlegen eines Potentials kann je nach Ionisationstechnik ein Potentialgradienten ausgebildet und der Iontentransfer so zusätzlich optimiert werden.

3.5 Ionenquelle Sprayionisation

Für die durchgeführten Sprayionisationsexperimente wurde die in Abb. 3.9 gezeigte Airbrush Düse verwendet. Der Vorteil ist, dass diese kommerziell erhältliche Düse mit Vorratsbehälter leicht für individuelle Zwecke angepasst werden kann. Auch die Reinigung und Wartung des Düsenausgangs sind schnell durchführbar. Der Durchfluss des Probevolumens ist regelbar und

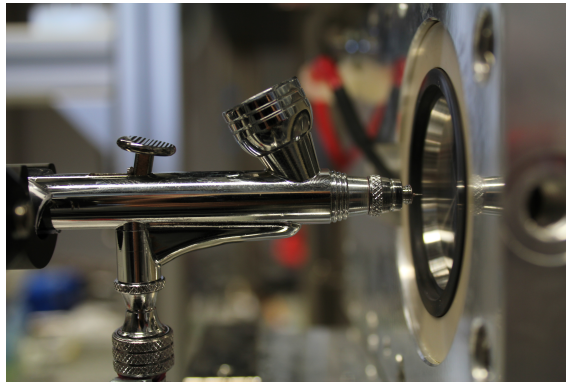


Abbildung 3.9: Genutzte Ionenquelle zur Sprayionisation.

kann fest eingestellt werden. Durch einen Adapter kann das Gefäß zur Probenaufbewahrung einer Flüssigkeit direkt an die Ionenquelle angeschlossen werden, so dass ein kontinuierlicher Probenfluss möglich ist. Die genutzte Flussrate beträgt bei den Experimenten $10 \mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Für diese Art der Ionisation wird der Platteneinlass verwendet, da dieser eine definierte Oberfläche darstellt, auf der das Spray auftreffen kann und so die Justierung erleichtert ist.

Kapitel 4

Laserdesorption/ionisation aus akustisch levitierten Tropfen

Die Ergebnisse dieses Kapitels finden sich auch in der Publikation in *Analytical Chemistry, Anal. Chem.*, 2015, 87 (16), pp 8323–8327.

DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01495>

4.1 Einleitung

Im Kapitel 1.2 wurde der Kugellinsencharakter des levitierten Tropfens bereits erwähnt. Aus dieser sphärischen Form des Tropfens resultieren inhärente Probleme bei der Durchführung spektroskopischer Analyseverfahren. Dadurch, dass der Tropfen eine gebogene Oberfläche bei einem hohen Brechungsindex besitzt, wie z.B. auch Linsen, kann der Strahlengang eines auf bzw. durch den Tropfen gerichteten Licht- oder Laserstrahls stark beeinflusst werden. Der effektive Brennpunkt des millimetergroßen Tropfens befindet sich kurz hinter dem Tropfen, somit führen selbst kleine Veränderungen der Tropfengröße zu einer relativ starken Verschiebung des gesamten Strahlengangs und des Brennpunktes selbst. Dies bringt Probleme bei der Anregung und Detektion in spektroskopischen Untersuchungen mit sich. Pragmatisch kann versucht werden diese Probleme durch eine dynamisch anpassende Instrumentierung zu umgehen. Auch die Zugabe eines internen Standards ist denkbar. [39]

Somit ist es wichtig zusätzliche Informationen aus dem Tropfen zu erhalten, um die Probleme bei der Auswertung spektroskopischer Analysen zu minimieren bzw. zu umgehen. Die Massenspektrometrie bietet die Gelegenheit neben schwingungsbasierten auch molekulare Masseninformatoren aus einem levitierten Tropfen zu gewinnen. Wie in Kapitel 2.2.1 bereits aufgegriffen haben die Gruppen von Westphall *et al.* und Stindt *et al.* die Laserdesorption bereits genutzt, um Moleküle und gebildete Ionen aus den schwebenden Tropfen in das Massenspektrometer zu überführen. [67, 14] Sie unterschieden sich in der genutzten Wellenlänge, dem absorbierenden Medium und der zusätzlichen Anwendung einer Coronaentladung. Die aufwendige oftmals fehlerbehaftete Probenvorbereitung und automatisierten Ladungs- bzw. Desorptionsschritte bei Westphall *et al.* wurden durch Stindts Einsatz der Wellenlänge $10,6\mu\text{m}$ bereits umgangen. Als Lösungsmittel und Infrarot (IR)-Chromophor wird Glycerin verwendet, wodurch keine zusätzliche absorbierende Substanz zugegeben werden muss.

Der Ansatz nicht ein zusätzliches, beigemengtes Chromophor zu verwenden oder den La-

dungszustand des Tropfen exogen durch eine Coronaentladung zu verändern, soll bei zukünftigen Laserdesorptionsexperimenten beibehalten werden. Im Gegensatz zu der zuvor erwähnten Methode von Stindt sollen nun Wasser und Alkohole als gängigere Lösungsmittel verwendet werden. Die Experimente beruhen auf den veröffentlichten IR-MALDI-Experimenten von Lai-ko *et al.* aus dem Jahr 2002. [68] Die Laserwellenlänge $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ führt zur Anregung der OH-Streckschwingung von Wasser und Alkoholen, welche sich an der Oberfläche von wässrigen oder alkoholischen Tropfen befinden. Dadurch, dass keine zusätzlichen Chromophore eingesetzt werden müssen, können weitere Probleme, wie z.B. eine ineffiziente Verdampfung von viskosen Substanzen, was auch bei dem Einsatz von Glycerin problematisch ist, vermieden werden. Diese spezifischen Absorptionseigenschaften wurden bereits für ein Massenspektrometer-System von Rapp *et al.* [69] ausgenutzt. Er nutzte jedoch keinen levitierten Tropfen sondern einen fallenden pL-Tropfen. Anwendung findet diese Methode bereits bei Charakterisierung von großen Biomolekülen wie die Adenosintriphosphat-Synthase ($m/z = 542 \text{ kDa}$) von Bakterien [13] oder in mikrofluidischen Systemen, welche eine Laserionisation-Massenspektrometrie nutzen. [70] Die aus den genannten Experimenten erhaltenen Erfahrungen sollen in diesem Kapitel kombiniert werden und zeigen, dass eine Laser Desorption Ionisation (LDI) bei $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ aus einem wässrigen bzw. alkoholischen levitierten Tropfen samt genannter Vorteile möglich ist.

Im Jahr 2005 hat die Gruppe von Hillenkamp eine starke Abhängigkeit der Pulsdauer τ_p des genutzten Lasers und dem Desorptionsverhalten in IR-MALDI Experimenten im Vakuum bei der Verwendung von flüssigen Matrices festgestellt. [71, 72] Diese beobachtete Korrelation wurde den unterschiedlichen Dissipationseigenschaften von induzierten Druck- und Temperaturänderungen des Lösungsmittels zugeschrieben. Ein 6 ns Puls führt zu einer Ablation, die etwa dem Zeitprofil des Pulses entspricht; hingegen induziert ein 100 ns Puls einen langen Desorptionszeitraum von $\approx 1 \mu\text{s}$. Die beiden erhaltenen Spektren sind nicht von einander zu unterscheiden. Die Zeit gleicht nahezu der Relaxationszeit im angeregten Volumen. Die-

ses Verhalten während der Desorptionsexperimente wurde mittels Dunkelfeldmikroskopie und Streulichtabbildungsexperimenten in Zusammenhang mit dem induzierten akustischen Stress gestellt. Pulsdauern von Lasern, die länger sind als das angeregte System benötigt, um in Ruhelage zu gelangen, scheinen dabei eher in einem gleichmäßigen Desorptions-/Ablationsverhalten zu resultieren. Mechanistisch ist die resultierende thermisch bedingte Desorption als eine sanfte Kombination aus IR-MALDI und Thermospray Ionisation, bei der Analyt und Eluent erhitzt sowie zerstäubt werden, zu betrachten. [73] Dennoch zeigen die Experimente in beiden Fällen austretendes Material noch Zehntel Mikrosekunden nach dem eigentlichen Laserpuls. Dieses Postpuls-Phänomen wurde bereits vorher für Desorptionsexperimente unter Atmosphärendruck von Vogel *et al.* [74] beschrieben und zeigen größere, langsamer ausgeworfene Tropfen. Der zugrundeliegende Rückstoß-Effekt (*engl.* recoiled-induced material expulsion) scheint zu einem Ausstoß von Tropfen von bis zu Hundertstel von Mikrosekunden zu führen.

4.1.1 Methodischer Beitrag zu einem Totalanalysesystem

Für eine kontaktlose Probenhandhabung ist eine Levitationstechnik unabdingbar. Beide bisher dominierenden Methoden sind zunächst zur Kopplung mit der Massenspektrometrie geeignet. Die Komplette Automatisierung der Methode von Westphall ist sogar sehr gut geeignet für eine komplette Automatisierung eines TAS oder μ -TAS und wäre auch für die von Stindt verwendete Methode realisierbar. Problematisch hingegen ist die auf den Tropfen übertragene Ladung, da diese die physikochemische Umgebung innerhalb des Tropfens stark beeinflusst und so zwar ein Monitoring der chemischen Zusammensetzung möglich ist, aber die Einflüsse der Methode unberücksichtigt bleiben. Somit sollten solche drastischen, schwer zu reproduzierbare Veränderungen bei der Implementierung in TAS-Instrumente vermieden werden, um möglichst genaue Messungen durchführen zu können. Stindt *et al.* haben dies berücksichtigt und diese Fehlerquelle eliminiert. Die Probleme bei der Verwendung in μ -TAS resultieren bei der dort verwendeten Methode aus dem verwendeten Lösungsmittel. Glycerin ist hoch viskos,

weshalb dieses Lösungsmittel generell selten genutzt wird. Mit der hohen Viskosität einher geht eine geringe Volatilität. Dies führt dazu, dass die Effektivität der Desorption und die folgende Verdampfungseffektivität nachteilig beeinflusst werden. Somit ist die Verwendung von Glycerin grundsätzlich mit geringer Ionentransmission und gleichzeitig einem an Bedeutung gewinnenden Memory-Effekt verbunden. Bei einer μ -TAS mit kleinsten Probevolumen muss eine Verunreinigung durch vorherige Messungen ausgeschlossen werden. Dies kann durch die Verwendung von Glycerin nur schwer realisiert werden.

Ein TAS unter Zuhilfenahme der akustischen Levitation bedarf somit eines gängigen, volatilen und nicht hoch-viskosen Lösungsmittels. Diese Aspekte können mittels der Laserdesorption bei $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ aus dem levitierten Tropfen realisiert und Wasser oder Alkohole als Lösungsmittel genutzt werden.

4.2 Experimenteller Aufbau

Instrumentation

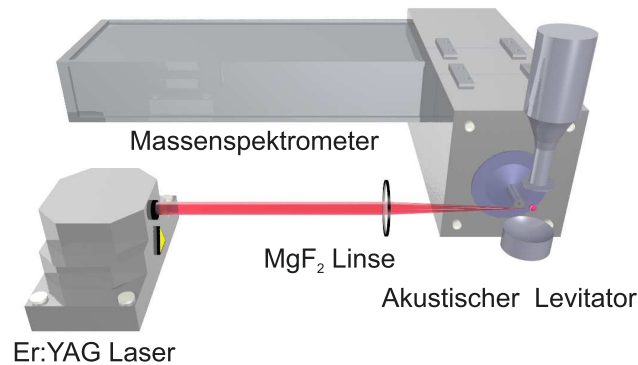


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des LDI Aufbaus.

Der experimentelle Aufbau basiert auf einer bereits veröffentlichten und genannten Arbeit von Stindt *et al.* [14] aus dem Jahr 2013. In Abb. 4.1 ist ein schematischer Aufbau zu sehen, der den in der aktuellen Arbeit verwendeten Laser, welcher regulär in der Medizintechnik Verwendung findet, vor dem Massenspektrometer zeigt. Generell besteht der Aufbau aus einem akustischem Levitator, einem Laser und einem Massenspektrometer. Der Levitator wurde aus einem Schallkonverter (40 kHz, MTH, Henstedt-Ulzburg, Deutschland), einer Sonotrode und einem Reflektor im Abstand von $5/2 \lambda$ zusammengesetzt. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus des Levitators ist den vorangegangenen Veröffentlichungen zu entnehmen. [31, 14]

Die Tropfen eines Probevolumens von $5 \mu\text{L}$ ($d = 2 \text{ mm}$) werden mit Hilfe einer Pipette in einen Druckknoten des Levitators manuell injiziert. Anschließend werden die Tropfen mit einem gepulsten (6 mJ pulse^{-1} , $\tau_p = 60 \mu\text{s}$, 100 Hz), diodengepumpten Er:YAG-Laser ($\tau_p = 1 \mu\text{s}$ - 1 ms , DPM15, Pantec Engineering AG, Rugell, Liechtenstein) der Wellenlänge $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ bestrahlt. Dabei wird der Laserstrahl orthogonal zum MS-Einlass und mittig auf den Tropfen mit einer MgF_2 -Linse ($f = 100 \text{ mm}$, Thorlabs, USA) fokussiert. Anhand von Brandmuster auf

Photopapier wurde die Strahlbreite des Lasers bestimmt. Im Fokus ist der Strahl etwa $550\text{ }\mu\text{m}$ x $550\text{ }\mu\text{m}$ groß, was einer Fluenz von $\approx 4\text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ entspricht. Der Levitator wird so positioniert, dass sich der MS-Einlass an der Stelle des auftreffenden Laserstrahls auf das levitierte Probevolumen befindet.

Alle Experimente wurden an einem orthogonal beschleunigenden Atmosphärendruck Flugzeitmassenspektrometer (HToF-MS, Tofwerk AG, Thun, Schweiz) durchgeführt. Nach dem Eintritt des durch den Laserpuls desorbierten und verdampften Materials in das Massenspektrometer werden ausschließlich die entstandenen Ionen durch zwei aufeinander folgende, für den Ionentransport optimierte, hochfrequente Quadrupole in die orthogonale Beschleunigungszone des Flugzeitmassenspektrometers geleitet. Die Repellerspannung zur orthogonalen Beschleunigung wurde auf $U_{rep.} = 800\text{ V}$ festgelegt. Jedes im Folgenden gezeigte Spektrum wurde aus der Summe von 100 Laserpulsen erhalten, da eine Messung etwa eine Sekunde andauert und über fünf individuelle Messungen gemittelt wurde. Obwohl ein Desorptionsprozess nur einen minimalen Anteil des Volumens verbraucht, wird nach jeder Messung ein neuer Tropfen in den Levitator eingebracht, um Konzentrationsschwankungen durch Verdampfungseffekte zu kompensieren. Wird ausschließlich Wasser als Lösungsmittel verwendet führt dies zu Massenspektren einer schlechten Reproduzierbarkeit. Um diesem Problem entgegenzuwirken wird Methanol als Teil der Analytlösung hinzugegeben, was zu einer deutlichen Erhöhung der Reproduzierbarkeit führt. Dies ist auf die bessere Verdampfung des desorbierten Materials/Lösungsmittels zurückzuführen. Daher werden alle aufgenommen Spektren aus einer Lösung von $50\text{ }\%_{vol}$ Methanol ($\chi_{H_2O} = 0,69$) erhalten.

Die Pulsdauer des Er:YAG-Lasers ist variabel und kann so durch vorherige Evaluation für die jeweiligen Fragestellungen angepasst werden. Zur Bestimmung der Eindringtiefe des Laserstrahls in den Tropfen kann der Lambertsche Absorptionskoeffizient bei der Betrachtung heran gezogen [75] und durch die folgende Näherung bestimmt werden: $\alpha_{2,95\mu m}^{-1} \approx 0,8\text{ }\mu\text{m}$. Dies resultiert in einer thermischen Diffusion $\tau_{th} \approx 1\text{ }\mu\text{s}$ und einer akustischen Diffusion von

$\tau_{as} = 0,5\text{ ns}$ im Tropfen. Somit gilt für alle möglichen Pulsweiten des genutzten Lasers, dass die Desorption weder akustisch noch thermisch limitiert ist. Interessanterweise ist das beste Ergebnis mit den höchsten Signalintensitäten bei einer mittleren Pulsdauer von $60\text{ }\mu\text{s}$ erhalten worden. Dieser Wert scheint ein idealer Kompromiss zu sein zwischen Energieverlusten durch schnelles Sieden bei kurzen Pulsen und die generell geringere Laserleistung, bei konstanter Pulsenergie, aber längerer Pulsdauer. Obwohl die zeitlichen Zusammenhänge des Evaporationsprozesses auf einen Rückstoß-Mechanismus hinweisen, gibt es bisher dazu keine experimentellen Beweise. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass eine sehr effektive Reflektion der akustischen Schockwelle innerhalb des Tropfens stattfindet. Dies würde zu einer enormen Verlängerung der Relaxationszeit führen. Im Weiteren wird eine feste Pulsdauer von $60\text{ }\mu\text{s}$ für alle Experimente genutzt.

Um eine möglichst gute Transmission von desorbiertem Material zu erhalten, wurde der in Abschnitt 3.7 beschriebene zylindrische Einlass verwendet. Er bietet ausreichend Abstand und eine lange Flugstrecke zum ersten Quadrupol, wodurch die Verdampfung von Lösungsmittel begünstigt wird. Der Abstand zur Einlassöffnung beträgt $\approx 10\text{ mm}$ und ermöglicht so eine Laserdesorption nahe am Einlass.

Verwendete Chemikalien

Als Lösungsmittel wird eine 1:1 (v/v) Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Methanol ($> 99,9\%$ pure, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) Mischung verwendet. L-Arginin ($> 98,0\%$) und Bradykininacetat ($> 98,0\%$) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Reserpin ($> 98,0\%$) und Rifampicin ($> 95,0\%$) von Acros Organics (Geel, Belgien) und Vancomycin Hydrochlorid ($> 93,0\%$) von AppliChem bezogen. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Alle Strukturformeln der betreffenden Analyten sind in Abbildung 4.2 dargestellt und zeigen bereits, dass ein weites Spektrum unterschiedlicher Stoffklassen abgedeckt werden kann.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

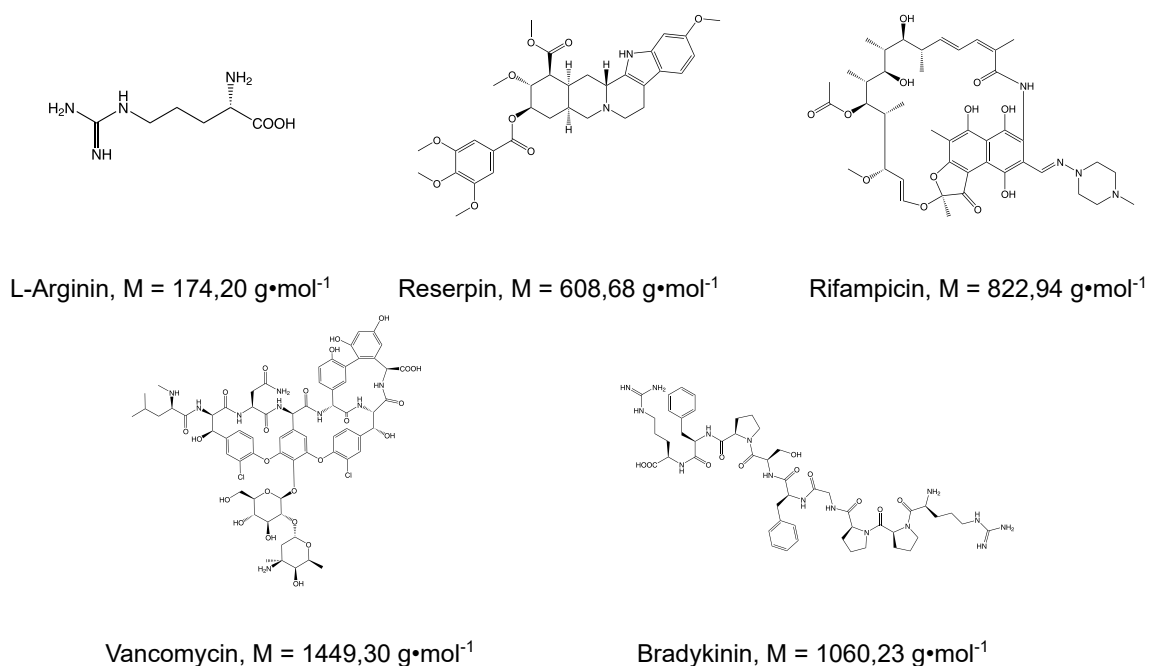


Abbildung 4.2: Strukturformeln der für die LDI verwendeten Analyten inklusive deren molekularer Masse.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Ein Massenspektrum aus einem 5 μL Tropfen einer 100 μM L-Arginin Lösung ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Das Spektrum zeigt deutlich das Analyt ionensignal sowie wenig intensive Signale von Matrixmolekülen. Es sind lediglich zwei Signale unterhalb eines Massenbereichs von $m/z = 150$ detektierbar. Diese können Ionenclustern aus dem Lösungsmittel Methanol zugeschrieben werden. Normalerweise sind MALDI Spektren von solch relativ kleinen Substanzen eher schwer zu beschreiben, da Fragmentierung von Matrixmolekülen zu starken Interferenzen führen können. Insbesondere die AP-MALDI hat das Problem des sogenannten „Chemischen Rauschens“ in niedrigen Massebereichen. [76] Dementsprechend ist die sehr schwache Interferenz von Matrixmolekülen bei der Ionisation aus einer 100 μM Lösung erstaunlich. Das Spektrum selbst ist dominiert von der Analyt ionen-Clusterprogression der Form $[n \text{ M} + \text{H}]^+$ mit $n = 1, 2, 3$. Diese Clusterbildung kann durch die Kollision von Analyt ionen und/oder neutralen

Molekülen erklärt werden. Die Geometrie des Einlasses erzeugt eine Region mit einer stetigen Kollision zwischen den Molekülen, gefolgt von einer Expansion ins Vakuum des Instrumentes. Dementsprechend werden durch Kollision gebildete und angeregte Cluster bei einer isentropischen Expansion ins Vakuum herunter gekühlt. Da im Anschluss eine Kollision entlang der Ionentrajektorien unwahrscheinlich ist, können geformte Cluster nicht mehr dissoziieren und werden in den Analysator überführt bzw. später detektiert.

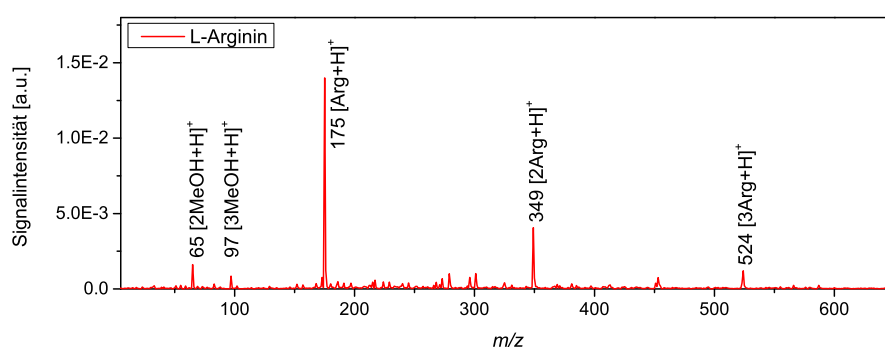


Abbildung 4.3: Laser Desorption/Ionisation (LDI) Spektrum eines $5\ \mu\text{L}$ Tropfens einer $100\ \mu\text{M}$ L-Arginin Lösung (der gerade m/z Wert für das $[3\ \text{Arg}+\text{H}]^+$ Signal resultiert aus Rundungen; die exakte Masse ist 523,61 Da).

Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen konnte keinerlei Fragmentierung der Arginin Moleküle durch z.B. eine Abspaltung von H_2O oder NH_3 beobachtet werden. [77, 78] In den vergleichbaren Experimenten von Stindt *et al.* wurden zusätzlich Natrium- und Kaliumaddukte beobachtet, welche typischerweise den Unreinheiten der verwendeten Matrix zuzuschreiben sind. Durch die Zugabe von geringen Mengen Trifluoressigsäure (TFA) können diese unterdrückt werden.[14] Diese Art der Alkaliaddukte konnte unter normalen Bedingungen in den durchgeführten Laserdesorptions-Experimenten nicht beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die bei der Er:YAG Laserdesorption eines Tropfens erhaltenen Spektren wenig Interferenzen durch Matrixmoleküle aufweisen. Eine Zugabe von TFA zur Unterdrückung von Alkaliaddukten oder zum Intensivieren von Signalen ist daher nicht notwendig. Die Methode kann somit für

eine direkte Bestimmung von Analyten aus einem levitierten, flüssigen Tropfen genutzt werden.

Um die Einsetzbarkeit der Methode für z.B. kinetische Studien zu überprüfen und eine Abschätzung der Sensitivität zu erhalten, wurde der Anteil der desorbierten Flüssigkeit bestimmt. Dieses wurde durch eine sukzessive Aufnahme von Makrophotos und einer Berechnung des Tropfenvolumens vor und nach dem Laserpuls erzielt. Die für die Bestimmung des Tropfenvolumens wichtigen Radien und die Exzentrizität der elliptischen Projektion wurden mit Hilfe der Software ImageJ (National Institute of Health, USA) ausgemessen. Das Design des akustischen Levitators beschreibt eine zirkuläre Symmetrie, so dass die axiale Symmetrie des levitierten Tropfens eine Berechnung des Volumens mithilfe eines Bildes aus einer Perspektive ermöglicht. Durch einen Vergleich der erhaltenen Aufnahmen vor und nach den 100 Laserpulsen kann eine Desorption von $V=100$ nL angenommen werden. Bei den verwendeten $100\text{ }\mu\text{M}$ Lösungen entspricht dies einem Verbrauch von $100\text{ }\mu\text{mol}$ pro Messung bei einem Signal, welches intensiv genug ist, um ein Trimer der Analyten zu detektieren (Vgl. Abb. 4.3). Dies bedeutet, diese Technik kann eine multiple Informationsabfrage aus einem einzigen Tropfen ermöglichen bei einer Sensitivität, die für die meisten kinetischen Experimente ausreichend ist.

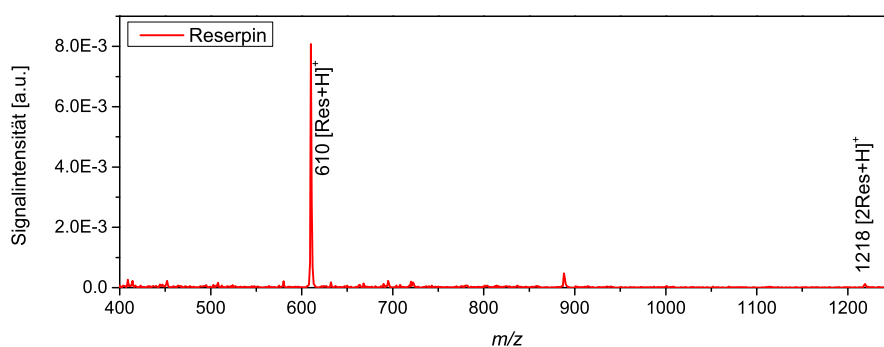


Abbildung 4.4: LDI Spektrum von $5\text{ }\mu\text{L}$ Tropfen einer $100\text{ }\mu\text{M}$ Reserpin Lösung (der gerade m/z Wert für das $[\text{Res}+\text{H}]^+$ Signal resultiert aus Rundungen; die exakte Masse ist $609,69\text{ Da}$).

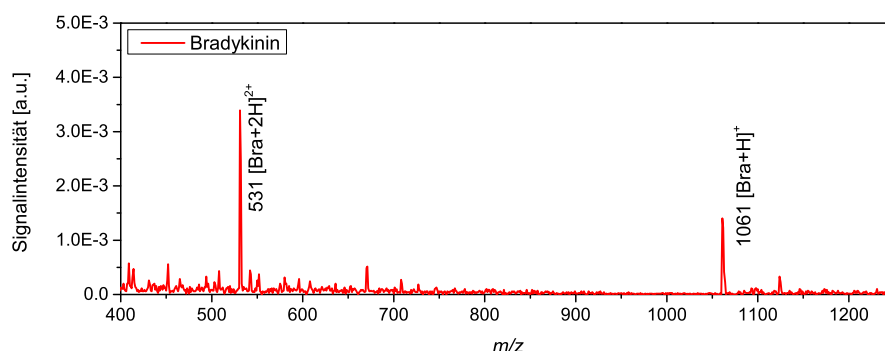


Abbildung 4.5: LDI Spektrum von 5 μL Tropfen einer 100 μM Bradykinin Lösung; die exakte Masse von Bradykinin ist 1060,23 Da.

Nachdem die Machbarkeit mit einem kleineren Molekül bewiesen wurde, soll die allgemeine Anwendbarkeit der beschriebenen Methode untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die aus dem Tropfen erhaltenen Spektren der zwei pharmazeutisch-aktiven Substanzen Reserpin und Bradikinin aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 4.4 und 4.5 dargestellt. In beiden Fällen sind die intakten, protonierten Analytmoleküle die einzigen Signale im abgebildeten Bereich. Wie beim L-Arginin kann bei Verwendung des natürlichen Alkaloids Reserpin eine Analyt Clusterprogression des einfach protonierten Analyten beobachtet werden. Hingegen können im Spektrum des kleineren Peptides Bradikinin die ersten beiden Zustände einer Ladungsserie $[\text{M} + n \text{H}]^{n+}$ mit $n = 1, 2$ detektiert werden. Die Betrachtung der molekularen Masse von Bradykinin (1060,22 Da) entspricht der von Fenn *et al.* [79] beschriebenen Ladungsstatistik, welche 1989 für eine Elektrospray Ionisation beschrieben wurde. Dem empirischen Trend folgend neigen vor allem Peptide und Proteine dazu eine zusätzliche Ladung pro kDa Molekularmasse aufzunehmen. Dies steht im Zusammenhang mit einer Protonierung des N-Terminus und der statistischen Häufigkeit der stickstoffhaltigen Aminosäuren Lysin, Arginin, Prolin und Histidin. Auch wenn ursprünglich die Ladungsserien nur Elektrospray-Experimenten zugeschrieben wurden, haben in den letzten Jahren mehrere Gruppen bereits diese Serien von mehrfach geladenen Ionen durch eine Laserdesorption beobachten können. [80, 81] Auch wenn der

genaue zugrundeliegende Mechanismus für einfach bzw. mehrfach geladene Ionenbildung für die AP-MALDI noch nicht komplett geklärt ist, scheinen die Laserfluenz, AP-Konditionen und die Wahl der Matrix eine entscheidende Rolle zu spielen. [82] Übereinstimmend mit den hier gezeigten Entdeckungen bilden insbesondere flüssige Matrices bzw. eine flüssige Probendarreichungsform mehrfach geladenen Ionen. Darüber hinaus zeigen alle Experimente, die eine geheizte Einlasskapillare bei der AP-Laserionisation benutzen, Mehrfachladungen. Der Vergleich mit den in dieser Studie gezeigten Ergebnissen lässt vermuten, dass das System ein Ladungsgleichgewicht oder thermischen Gleichgewichtszustand erlangt während es die erste Pumpstufe erreicht. Dies führt zu einfach oder mehrfach geladenen Ionen. Hingegen wurden in den vorangegangenen Experimenten die in der Gasphase befindlichen Analyt/Lösungsmittel-Cluster erhitzt und innerhalb der Einlässe desolvatisiert. [80, 81] In dem hier gezeigten kontaktlosen Ansatz kann die thermische Anregung der Analyt/Lösungsmittel-Aerosole durch die IR-Absorption erklärt werden.

Die beschriebene Ionisation von Analyten aus H₂O/MeOH Tropfen resultiert in Monomeren und Clustern von einfach protonierten Analytmolekülen bei kleinen Molekülen und mehrfach protonierten bzw. geladenen Spezies bei größeren Molekülen ($m > 1$ kDa), insbesondere bei Peptiden. Um einen tieferen Einblick zu erhalten, wo der Grenzwert für die Mehrfachladungen liegt, wurden die Spektren von zwei weiteren Analytmolekülen ausgewertet. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurden Moleküle mit $m < 1$ kDa und $m > 1$ kDa ausgewählt. Um weitere Stoffklassen zu untersuchen, werden keine Peptide verwendet sondern die Antibiotika Rifampicin und Vancomycin, wobei Letzteres das bisher größte detektierte Molekül ist. Die Spektren der Analyten sind in der Abb. 4.6 und 4.7 gezeigt. Wie zu erkennen ist, kann Rifampicin nur einfach geladen als M+H und M+Na detektiert werden. Dabei kann es sich um protonierte Spezies oder positiv geladenene Natriumaddukte handeln. Da in den anderen Spektren keine Addukte erkennbar sind, ist davon auszugehen, dass das Natrium aus Unreinheiten des kom-

merziell erworbenen Produktes ($> 95,0\%$ Reinheit) selbst stammt. Weder Ausbildung größerer Cluster, noch mehrfachgeladene Ionen konnten detektiert werden (der Massenbereich ist nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu ist in der Abb. 4.7 zu erkennen, dass Vancomycin als einfach und mehrfach geladenes Monomer und Dimer detektiert werden kann.

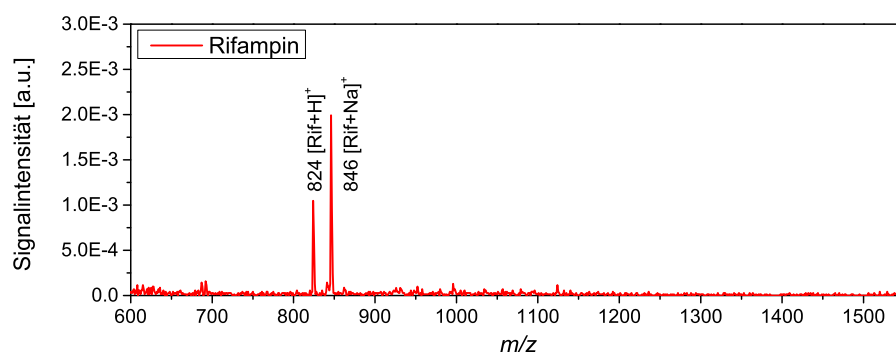


Abbildung 4.6: LDI Spektrum eines 5 μL Tropfens einer 100 μM Rifampicin Lösung; die exakte Masse von Rifampin ist 822,94 Da.

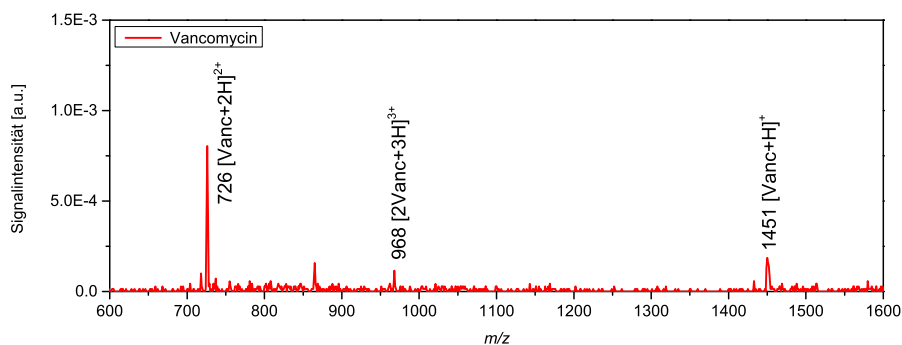


Abbildung 4.7: LDI Spektrum von Vancomycin aus einem 5 μL Tropfens einer 100 μM Vancomycin-hydrochlorid Lösung; die exakte Masse von Bradykinin ist 1449,30 Da.

Verglichen mit den vorher veröffentlichten Ergebnissen von Stindt *et al.* [14] führt der Gebrauch von Wasser/MeOH-Mischungen anstelle von Glycerin zu einer drastischen Intensitätssteigerung der Ionensignale. In beiden Fällen können die erhaltenen Spektren mit den Er-

gebnissen von Spray-Ionisationsexperimenten verglichen werden. Die Steigerung der Ionisationseffizienz kann durch das bessere Verdampfen des Lösungsmittels erklärt werden. Der hydrodynamisch relevanteste Unterschied zwischen Glycerin und Wasser/MeOH-Mischungen ist die Viskosität von $\eta = 1480,0$ mPa·s für Glycerin im Vergleich zu $\eta \approx 1,8$ mPa·s für die Wasser/MeOH-Mischung. [83, 84] Diese Viskositätsunterschiede beeinflussen die Tropfengröße beim Desorptionsprozess am Tropfen dramatisch. Eine höhere Viskosität führt zu einer Abgabe von Tropfen größeren Volumens, was zu einer geringeren Ionisationseffizienz führt. Im nächsten Kapitel wird der Einfluss der Tropfengröße auf die Ionisation genauer erläutert. Neben der Tropfengröße spielt der Dampfdruck eine entscheidende Rolle. Glycerin hat einen Dampfdruck von $p < 0,001$ mbar und ist damit signifikant geringer als der der verwendeten Wasser/MeOH-Mischung mit $p \approx 55$ mbar. Somit scheint eine Ionenbildung aus Mikrotropfen entsprechend dem generell akzeptierten *Charge Residue Model* von Kebarle stattzufinden. [85] Es besagt, dass letztendlich nur sehr kleine Tropfen mit nur einem ionisierten Analytmolekül verbleiben. Gleichzeitig kann davon ausgegangen werden, dass die bessere Desolvatation der geladenen Tropfen, welche in das MS überführt werden, zu dem geringen Hintergrundsignal aus den Lösungsmitteln beitragen.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Eine verbesserte Methode der Kopplung von akustisch levitierten Tropfen an ein Massenspektrometer konnte gezeigt werden (Vgl. Ref. [86]). Der Gebrauch eines Er:YAG Lasers macht die Laserionisation zugänglich für die Detektion von Analyten aus wässrigen und alkoholischen Lösungen. Dabei wurde speziell dieser Laser verwendet, um mit einer nicht im Druck limitierten Desorption zu arbeiten. Die Informationsabfrage aus dem Tropfen bedarf keinem zusätzlichen Chromophor bzw. Dopant und induziert keine drastischen Druck- oder Temperaturveränderungen. Mit Hilfe dieser Ionisationstechnik können Analyten mit molekularen Massen von $m \approx 1$ kDa mit protonaffinen Seitengruppen auch mehrfach geladen detektiert werden.

Kleinere Massen sind als $[M+H]$ und Clustern aus Addukten detektierbar.

Mit Hilfe dieser neuen Methode kann die gesamte Probenhandhabung kontaktlos durchgeführt werden. Dazu zählt die Desorption, Ionisation und der Ionentransport in das Massenspektrometer. Für ein TAS ist es notwendig Kontaminationen und Memory-Effekte u.a. durch Gefäßwandkontakt zu vermeiden. Dies ist ausgeschlossen, sofern ein Tropfen permanent im Schwebezustand gehalten wird. Durch die Vermeidung von hoch viskosen Lösungsmitteln wird die Ionisationseffektivität und somit die Sensitivität erhöht. Dies ist besonders bei μ -TAS ein maßgeblicher Faktor, da nur sehr geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen. So muss eine Messung auch mit geringen Probevolumina verlässliche Ergebnisse liefern. Da diese Aspekte in der präsentierten Methode realisiert werden, ist der nächste Schritt eine Automatisierung des gesamten Ablaufes zu implementieren. So können schnell einzelne Tropfen auf die zu analysierenden Substanzen untersucht werden.

In Anbetracht der Schnelligkeit der Methoden und des geringen Verbrauchs bei einer einzelnen Messung könnten nicht nur viele Tropfen in kurzer Zeit sondern auch ein einziger über einen längeren Zeitraum betrachtet werden. Diese zeitlich aufgelöste Informationsabfrage ermöglicht es somit auch zukünftig kinetische Untersuchungen bzw. online Prozessanalytik am oder im levitierten Tropfen durchzuführen.

Kapitel 5

Sonic Spray Ionization

Die Ergebnisse dieses Kapitels finden sich auch in der gemeinsamen Publikation mit Dr. Arne Stindt im European Journal of Mass Spectrometry, Eur. J. Mass Spectrom., 2014, 20 (1), pp 21–29.

DOI: <https://doi.org/10.1255/ejms.1242>

5.1 Sonic Spray Ionisation als kontinuierliche Tropfenquelle

Eine Spray Ionisation, ohne Spannung bzw. Hitze an die Sprühquelle anzulegen oder eine Photoionisation durchzuführen, ist eine sehr sanfte Form der Ionisation. Diese Möglichkeit Ionen aus einem gewöhnlichen Spray zu extrahieren, wurde im Jahr 1994 von der Gruppe um Hirabayashi zufällig entdeckt. [87] Sie fanden heraus, dass bei einer Geschwindigkeit des Trägergases von ≈ 1 Mach (entspricht der Schallgeschwindigkeit in Gasen) die effektivste Ionisation erhalten werden konnte. Konsequenterweise ist diese Technik Sonic Spray Ionization (SSI) genannt worden. Im Gegensatz zur bekannten Elektrosprayionisation (ESI) [88] können mit dieser Technik sehr schwache Komplexverbindungen ionisiert werden, ohne diese dabei zu zerstören. Zudem kann auf Zugabe von Redoxpuffern verzichtet werden und selbst aus purem Wasser kann eine Ionisation erfolgen. [89, 88] Trotz dieser bemerkenswerten Vorteile ist die SSI nicht weit verbreitet worden bis Cooks *et al.* die Methode etwa 10 Jahre später erneut aufgriffen hat. Sie benutzten diese ebenfalls für die Ionisation von intakten nicht-kovalent gebundenen Molekülen. [90, 91] In den darauf folgenden Jahren haben ebenfalls Eberlin *et al.* diese Technik genutzt und technische Verbesserungen vorgeschlagen. Sie haben die Methode erfolgreich z.B. für Desorptions/Ionisations Experimente genutzt. [92] Darüber hinaus haben sie die entstehenden Venturi-Kräfte genutzt, um eine Probenezufuhr zu gewährleisten. So sind weitere Pumpen für die Zufuhr der Probe in den Gasstrom überflüssig geworden. [93] Aufgrund dieser technischen Entwicklungen wurde diese Methode Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (V-EASI) genannt. Diese Namensgebung hat sich jedoch nicht durchgesetzt. Da die Erstveröffentlichung diese Technik anders nannte, wird im Folgenden die Bezeichnung Sonic Spray Ionisation verwendet.

Trotz dieses enormen Fortschritts ist die SSI bisher nicht als kommerziell erhältliches Instrument für die Standardanalytik zu erhalten. Dieses Problem wurde in einer Veröffentlichung von Antonakis *et al.* thematisiert und als ein grundlegendes Problem auf dem Weg zur Standardi-

5.1 Sonic Spray Ionisation als kontinuierliche Tropfenquelle

sierung bezeichnet. [89] Bisher mussten somit alle Experimente mit selbst designten und individualisierten Sprühquellen realisiert werden, was die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboren nur eingeschränkt ermöglicht. Daher wurde eine SSI Ionenquelle mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Zerstäubers für die induktiv gekoppelte Plasma (ICP) Analyse entwickelt. [89] Ein Vorteil der Verwendung von SSI Techniken ist, dass durch einen spannungsfreien Aufbau simultan sowohl positive als auch negative Massenspektren aufgenommen werden können ohne die Polarität der Ionenquelle ändern zu müssen. [94] Sie konnten sogar die Detektion von heptanuklearen Heterometallinen Clustern ermöglichen, welche sehr schwache Komplexbindungen besitzen.

Aus den Gemeinsamkeiten der erhaltenen Spektren von SSI und ESI lässt sich ein Zusammenhang zwischen den Ionisationsmechanismen ableiten. [95] Der Ionisationsmechanismus der ESI ist Teil vieler experimenteller und theoretischer Studien. [96, 97] Im Jahr 2004 wurde die Tropfengröße in Relation zur Ladung in einem ESI Spray gesetzt; dessen Verteilung wurde durch eine Kombination aus Doppler Interferometrie und Ionen-Mobilität Methoden bestimmt. [97] Der Solvatochromismus, also der Zusammenhang zwischen Solvatisationszustand und Fluoreszenzwellenlänge, von Rhodamin 6G kann für die orts aufgelöste Charakterisierung des Spraykegels der ESI durch spektral gefilterte Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF) genutzt werden. [98] Durch die Solvation von polaren Lösungsmitteln wie Wasser wird die energetische Position des angeregten und des Grundzustands des Fluorophors verschoben, so dass die Verteilung im Spray von nackten und solvatisierten Molekülen erhalten werden kann. Da bei der ESI Spannung angelegt wird, müsste somit die Ionenbildung bei der SSI einem anderen Mechanismus folgen. Um Einblicke in diesen Mechanismus zu bekommen, wurden bereits Experimente von Zilch *et al.* [99] durchgeführt. Die Ergebnisse aus Makrophotographie und Ladungsverteilungsmessungen mittels Massenspektrometrie bestätigen Studien, bei denen die Verteilung der Tropfengröße durch Ionen-Mobilitäts Studien bestimmt wurde. [100]

Die im Folgenden beschriebenen Experimente verfolgen zwei Absichten: *i* Es soll eine standardisierte Ionenquelle für die SSI Massenspektrometrie etabliert werden. Zu diesem Zweck wird vorgeschlagen eine kostengünstige, kommerziell bereits erhältliche Airbrush-Pistole zu nutzen. *ii* Information aus LIF (Verteilung der de-/solvatisierten Tropfen im Spray) und MS (analytische Fähigkeiten) Sprayversuchen sind hilfreich beim Verstehen, was in Aerosolen der Laserdesorption an akustisch levitierten Tropfen geschieht (Vgl. Kapitel 4.4). Die Sprayionisation hat zusätzlich den Vorteil eine kontinuierliche Tropfenquelle zu sein, so dass kein levitierter Tropfen der Analyse entzogen werden kann, aber permanent zur Simulation des Desorptionsprozesses kleinste Tropfen zur Verfügung stehen.

5.2 Nutzen der erhaltenen Informationen für Totalanalysesysteme

Die akustische Levitation soll seine Anwendung in μ -TAS finden. Dazu ist es wichtig die am Tropfen vorherrschenden und beeinflussenden Gegebenheiten zu kennen, um Probleme zu umgehen bzw. eine grundsätzliche Methodenoptimierung durchzuführen zu können. Die bei der Laserdesorption entstehenden Aerosole werden partiell in ein Massenspektrometer überführt. Dabei handelt es sich um ein Gas/Flüssig-Aerosol ähnlich einem Spray. Um tiefere Einblicke in diesen Prozess der Verdampfung, Ionisation, Desolvatation oder der räumliche Verteilungen zu erhalten, wird die SSI verwendet. Die erhaltenen Erkenntnisse tragen zur Vertiefung des Wissens über Evaporationsprozesse am levitierten Tropfen bei. Ebenfalls helfen sie räumliche Veränderungen in einem TAS zu optimieren, um neben spektroskopischen Analysen zusätzliche MS-Experimente in einem Instrument automatisch durchzuführen.

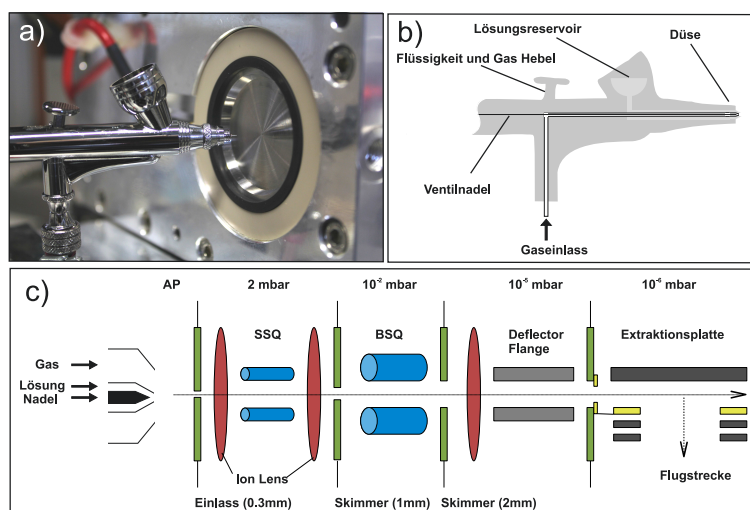


Abbildung 5.1: Experimenteller Aufbau: a) Foto der Airbrush Pistole vor dem MS Einlass. b) Schema der benutzten Airbrush Pistole. c) Schematische Darstellung der Atmosphärendruck-Kopplung des verwendeten MS.

5.3 Experimenteller Aufbau

Sonic Spray Ionisation Massenspektrometrie

Ein Foto und eine schematische Darstellung der Sprayionisationsquelle ist in Abb. 5.1 a) und b) zu sehen. Bei dieser handelt es sich um eine Sogolee HP-200 Airbrush Pistole (Airbrushes Equipments Co., Taiwan) mit einer einstellbaren Flussrate der verwendeten Probenvolumina. Es wird eine Flussrate von $10 \mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ eingestellt. Eine Mischung aus Methanol und Wasser (v/v 1:1) dient als Lösungsmittel. Zur Untersuchung verschiedener Aminosäuren und Peptide werden Lösungen von vier unterschiedlichen Analyten hergestellt. Dazu werden L-Lysin, Reserpin, Vancomycin Hydrochlorid aus einer Lösung der Konzentration $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Lysozym aus einer $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lösung mit reinem Wasser vernebelt. Zum Vernebeln dient Stickstoff als Trägergas bei einem typischen Stagnationsdruck von $\approx 2 \text{ bar}$. Die Airbrush Pistole wird auf eine in x,y-Richtung bewegliche Platte befestigt, um eine schnelle und einfache Justage parallel zum Einlass des Massenspektrometers zu ermöglichen. Der Abstand zwischen Airbrush-Düse und Einlassöffnung beträgt 10 mm. Auf den Einlass wird eine Spannung von 20 V gelegt, wobei

die Airbrush Pistole auf Masse gehalten wird. Die besten Ergebnisse werden bei einem axialen Versatz von 3 mm zwischen der Symmetrieachse des Sprühkegels und des Einlasses erhalten. Massenspektren werden über 3 s (Lysozym 60 s) gemittelt. Bei der gegebenen Flussrate entspricht dies einem Probenverbrauch von 30 μL Analytlösung bzw. 3 nmol Analyt. Als Einlass wird bei dieser Methode die Platte gewählt (s. Abb. 3.6).

Laser-induzierte Fluoreszenz

Für die LIF Experimente wird eine Lösung aus 220 mg L^{-1} Rhodamin B (Lambdachrome, Lambda Physik, Germany) in einer Mischung aus Methanol und Wasser (v/v 1:1) hergestellt und mit Hilfe der Airbrush Pistole vernebelt. Alle experimentellen Parameter werden von den vorangegangenen MS Experimenten übernommen. Die Einlassplatte wurde durch eine flache Elektrode ersetzt, die in 15 mm Abstand zur Düse angebracht wird, um die aerodynamischen Prozesse und elektrostatischen Konditionen des MS möglichst gut nachzuempfinden. Jedoch wird ein deutlich höherer Aerosolfluss im Verhältnis zum Sog in das MS durch das vorherrschende Grobvakuum angenommen. Ein frequenzverdoppelter Nd:YAG DPSS Laser (532 nm, 500 $\mu\text{J}/\text{Puls}$, 25 ns FWHM Pulsdauer, BLADE 25, Compact Laser Solutions, Deutschland) wird zur Anregung der Fluoreszenz genutzt. Durch ein Keplerteleskop wird der Laserfokus auf 20 mm aufgeweitet. Je nach Versuch wird die Repititionsrate zwischen 1 kHz und 20 kHz variiert. Die Aufnahmen der Fluoreszenz wurden mittels einer EOS 550D Kamera mit einem umgekehrt angebrachten EF-S 18-55 mm IS II Objektiv (beide Canon, Japan) aufgenommen. Die Belichtungszeit und das Auslösen der Kamera sowie die Synchronisation mit dem Laserpuls wird durch einen Delay Generator (DG 535, SRS, USA) gesteuert. Um das einfallende Laserlicht selbst nicht zu detektieren, wird ein 2 Zoll Filter (OG 515, Schott, Germany) vor das Objektiv der Kamera angebracht. Zur Analyse von De-/Solvationsprozessen wird zusätzlich ein 2 Zoll UV Kaltlichtspiegel (FM204, Thorlabs, Dachau, Germany) eingebracht, der Licht ab $\lambda = 556 \text{ nm}$ reflektiert und so zwischen den unterschiedlichen Solvationszuständen die

Fluoreszenz unterscheidbar macht.

Verwendete Chemikalien

Als Lösungsmittel wird eine 1:1 (v/v) Wasser ($\sigma < 2 \mu\text{S cm}^{-1}$, Carl Roth, Germany) Methanol ($> 99,9\%$ pure, Applichem, Darmstadt, Deutschland) Mischung verwendet. L-Lysin ($> 98,0\%$, Sigma-Aldrich, Germany), Reserpine ($98,0\%$, Acros Organic, Belgium) und Vancomycin Hydrochlorid ($> 93,0\%$, AppliChem, Germany) werden aus einer Lösungen der Konzentration von $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ vernebelt. Für Lysozym (molecular biology grade, AppliChem, Germany) wird eine $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lösung verwendet. Stickstoff ($99,99\%$, Air liquide) dient bei den Experimenten als Trägergas. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

5.4 Ergebnisse und Diskussion

Sonic Spray Ionisation Massenspektrometrie

Die erhaltenen Spektren von Lysin, Reserpin, Vacomycin und Lysozym sind im Folgenden dargestellt. Zwei der Analyten entsprechen den bereits in Kapitel 4.1 verwendeten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Sie decken einen weiten Massebereich ab und sind sofort detektierbar mit Hilfe der SSI. Im Falle von L-Lysin ($146,19 \text{ Da}$, Vgl. Abb 5.2) sind die Analytcluster der Form $[n \text{ M}+\text{H}]^+$ mit $n = 1, 2, 3, 4$ dominierend. Diese ausgeprägten Molekülcluster können mit einem guten Signal zu Rausch Verhältnis ($S/N = 806, 444, 70$ und 17 für Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer) detektiert werden. Die detektierten Ionen in den niedrigeren Massebereichen können protonierten Lösungsmittelclustern zugeschrieben werden wie $[n\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, $[n\text{MeOH}+\text{H}]^+$, $[n\text{MeOH}\cdot m\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ und ihren jeweiligen Alkaliaddukten. Diese Verunreinigungen sind in der Laser Desorption/Ionisation nicht bzw. selten detektiert worden. Es zeigt, dass bei einer Ionisation mit Gefäßkontakt eine deutliche Kontaminationsgefahr besteht. Darüber hinaus ist der Probeneintrag bei dieser Methode höher. So kann auch eine

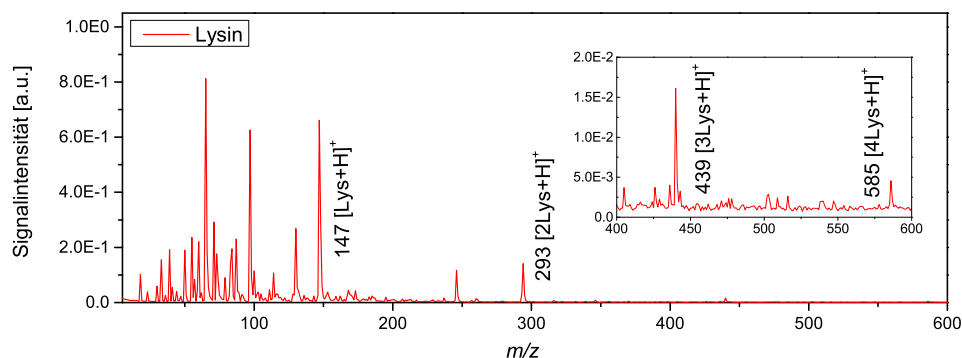


Abbildung 5.2: Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von L-Lysin (146,19 Da) aus 1:1 MeOH/H₂O Mischungen.

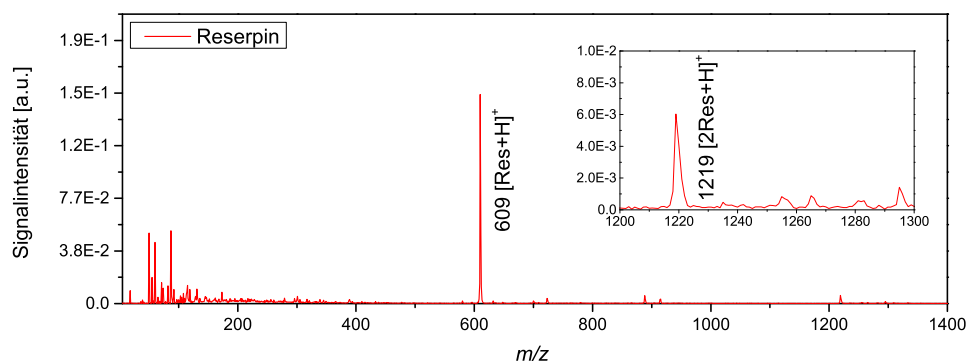


Abbildung 5.3: Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von Reserpin (609 Da) aus 1:1 MeOH/H₂O Mischungen.

größere Menge von protonierten Lösungsmittelclustern in das MS überführt und letztlich detektiert werden. Dennoch sind die Ergebnisse von guter Qualität, um einen Ionisationsprozess durch Vernebelung nachzuempfinden.

Das Hauptmerkmal im Spektrum von Reserpin (Vgl. Abb. 5.3) ist das protonierte Monomer. Auch ein sehr geringes Signal des Dimers ist erkennbar, wobei dieses etwa zwei Größenordnungen weniger intensiv ist. Reserpin folgt somit auch bei dieser Methode dem Trend: je größer das Molekül, desto geringer die Wahrscheinlichkeit Cluster zu bilden. Im Verhältnis zum Lysin-

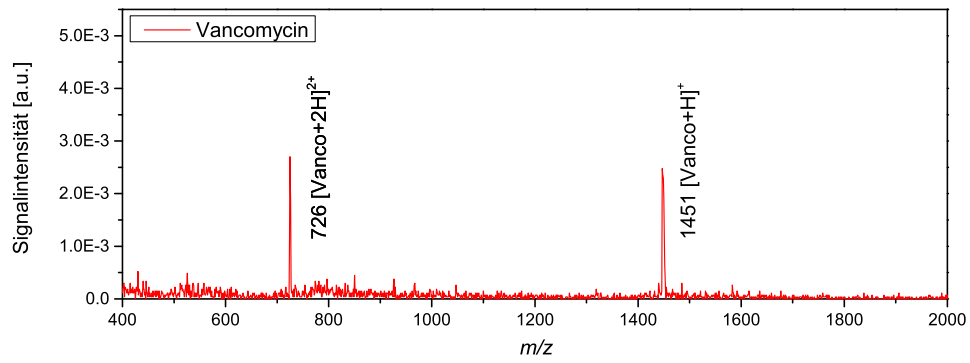


Abbildung 5.4: Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von Vancomycin (1450 Da) aus 1:1 MeOH/H₂O Mischungen.

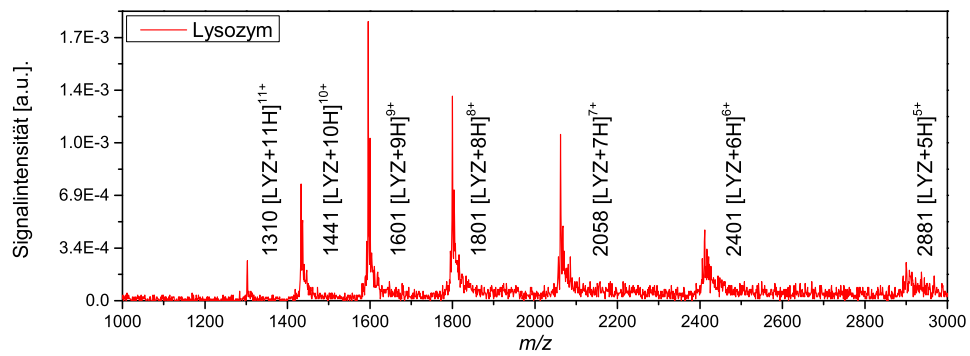


Abbildung 5.5: Aufgenommene SSI-Massenspektrum für Lösungen von Lysozym (14,3 kDa) aus H₂O.

spektrum sind hier die Matrix-Signale deutlich weniger stark ausgeprägt. Im Spektrum der Vancomycin Lösung bildet die doppelt protonierte Spezies das intensivste Ionensignal (Vgl. Abb. 5.4), wobei das einfach geladene Monomer nur eine geringfügig weniger intensive Ausprägung aufweist und somit das zweitintensivste Signal im Spektrum darstellt. Im Gegensatz zu dem kleineren Lysin und Reserpin können keine Cluster detektiert werden. Somit folgt die SSI den Erkenntnissen aus typischen ESI Versuchen bei denen der typische Grenzwert für eine doppelte Protonierung um $m = 1\text{kDa}$ liegen soll. [101] Diese „ein Ladungsträger pro kDa“-Regel wurde im vorangegangenen Kapitel 4.4 bereits aufgegriffen. Es hebt jedoch erneut hervor, dass eine Vergleichbarkeit der Methoden möglich ist.

Bei der SSI des sehr viel schwereren Polypeptids Lysozym bildet sich eine Ladungsserie von mehrfach geladenen Monomeren aus (Vgl. Abb. 5.5), welche verglichen werden können mit jenen aus ESI-Experimenten. Es ist bekannt, dass bei ESI-Messungen eine solche sehr breite Ladungsverteilung zustande kommt, sofern eine Denaturierung von Proteinen stattgefunden hat. [102] Dies ist auf die Entfaltung zurückzuführen: Ladungen können über ein größeres Volumen verteilt und die Coulomb-Abstoßung minimiert werden. Die beobachtete Ladungsserie ist asymmetrisch um das $[M+9H]^{9+}$ verteilt. Dabei ist $[M+5H]^{5+}$ der niedrigste und $[M+11H]^{11+}$ der höchste detektierte Ladungszustand mittels SSI.

Die erhaltenen Spektren können wie folgt kurz zusammengefasst werden: kleine Moleküle neigen dazu Cluster zu bilden und große Moleküle mehrfach protonierte Ionen. Diese Erkenntnisse decken sich mit den bekannten Experimenten von ESI und der Laserdesorption am akustisch levitierten Tropfen. [102, 103, 86] Sämtliche Spektren sind gut reproduzierbar und stabil. Zur Demonstration der Stabilität wurde ein EIC (engl. *extracted ion chronogramm*) von $[\text{Lys}+H]^+$ und $[2\text{MeOH}+H]^+$ aufgenommen und in Abb. 5.6 dargestellt.

Zur Visualisierung der Reproduzierbarkeit werden in Abb. 5.7 zwei individuell im Abstand

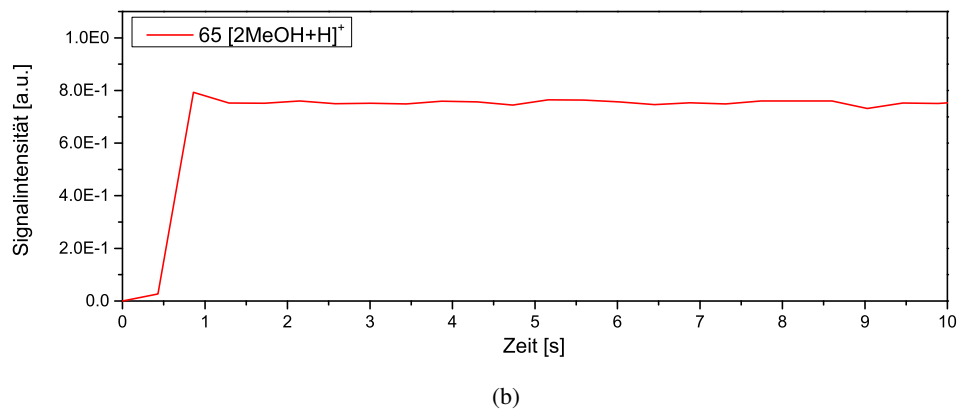
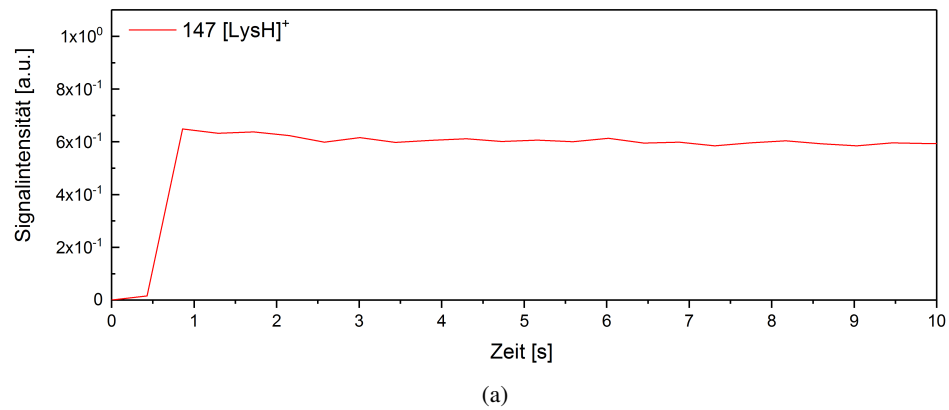


Abbildung 5.6: Extrahiertes Ionen Chromatogramm von a) $[\text{Lys}+\text{H}]^+$ und b) $[\text{2MeOH}+\text{H}]^+$, Ionensignale aus $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Lysin Lösung.

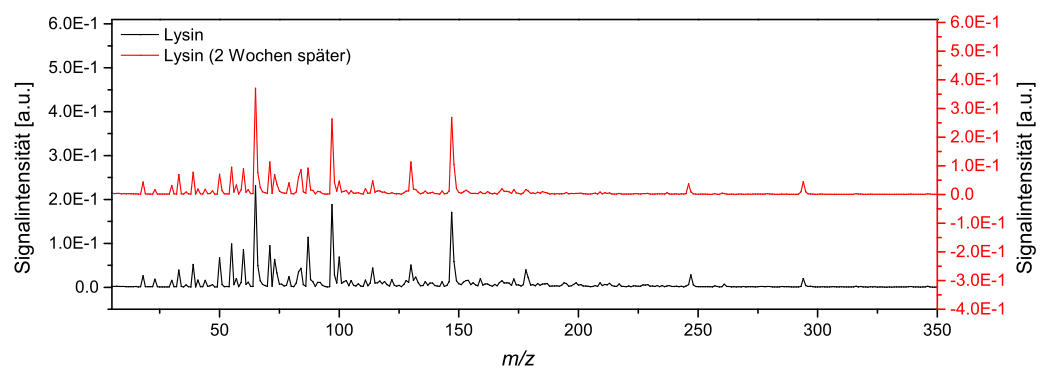


Abbildung 5.7: Zwei SSI Spektren von $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Lysin Lösungen, aufgenommen im Abstand von zwei Wochen. Das rote Spektrum hat einen Offset zur Verdeutlichung.

von zwei Wochen aufgenommene Spektren von Lysin gezeigt.

Laser-induzierte Fluoreszenz

Die bei der SSI-MS erhaltenen Spektren gleichen sehr denen, die bei der ESI-MS erhalten werden können. Das ist nicht intuitiv zu verstehen, da die Ionenbildung bei der ESI auf der Ladungsträgerseparation durch ein starkes elektrisches Feld basieren soll. [104] Ein ähnlicher Ionisationsmechanismus ohne angelegtes Potential kann durch statistische Verteilung von Ladungsträgern auf die entstehenden μm -großen Tropfen erklärt werden. Eine alternative plausible Erklärung folgt dem sogenannten „Bag Mechanism“. Dieser besagt, dass die Ladungsträgertrennung während des aerodynamisch induzierten Zerfalls der Tropfen geschieht. [99] Um einen besseren Einblick in die der SSI-MS zugrundeliegenden Prozesse zu erhalten, werden die LIF-Studien durchgeführt.

Abb. 5.8 a) zeigt die detektierte Fluoreszenz einer Rhodamin B Lösung, die bei identischen Bedingungen wie bei den SSI-MS Experimenten versprüht wurde. Während der Belichtungszeit von 2 Sekunden wurde die versprühte Lösung mit einem Laser bei einer Repitionsrate von 1 kHz beleuchtet. Der expandierende Sprühkegel hat einen Öffnungswinkel von etwa $2 \times 15^\circ$. In gleiche Ausbreitungsrichtung zeigt die Intensität der Fluoreszenz des Sprays eine sich stetig ausbreitende Gaus-Verteilung entlang der zentralen Achse. Vergleichbare räumliche Ausbreitungsformen wurden bereits für die ESI Experimente beschrieben. [98] Um weitere Berechnungen durchführen zu können, wurde das RGB Bild in eine Graufarben-Darstellung übersetzt, dessen Intensität die integrierte Fluoreszenz über die Fläche darstellt. Aus diesem kann wiederum ein Falschfarbenbild erzeugt werden, welches die Fluoreszenzintensität des Spraykegels repräsentiert (Vgl. Abb. 5.8b)). Durch die zylindersymmetrische Ausbreitung des Spraykegels, ist die detektierte Fluoreszenz einem zylindrischen Objekt zuzuschreiben. Sofern der Detektor parallel zur Symmetrieachse positioniert ist, kann die Projektion mit einer Abeltransformation

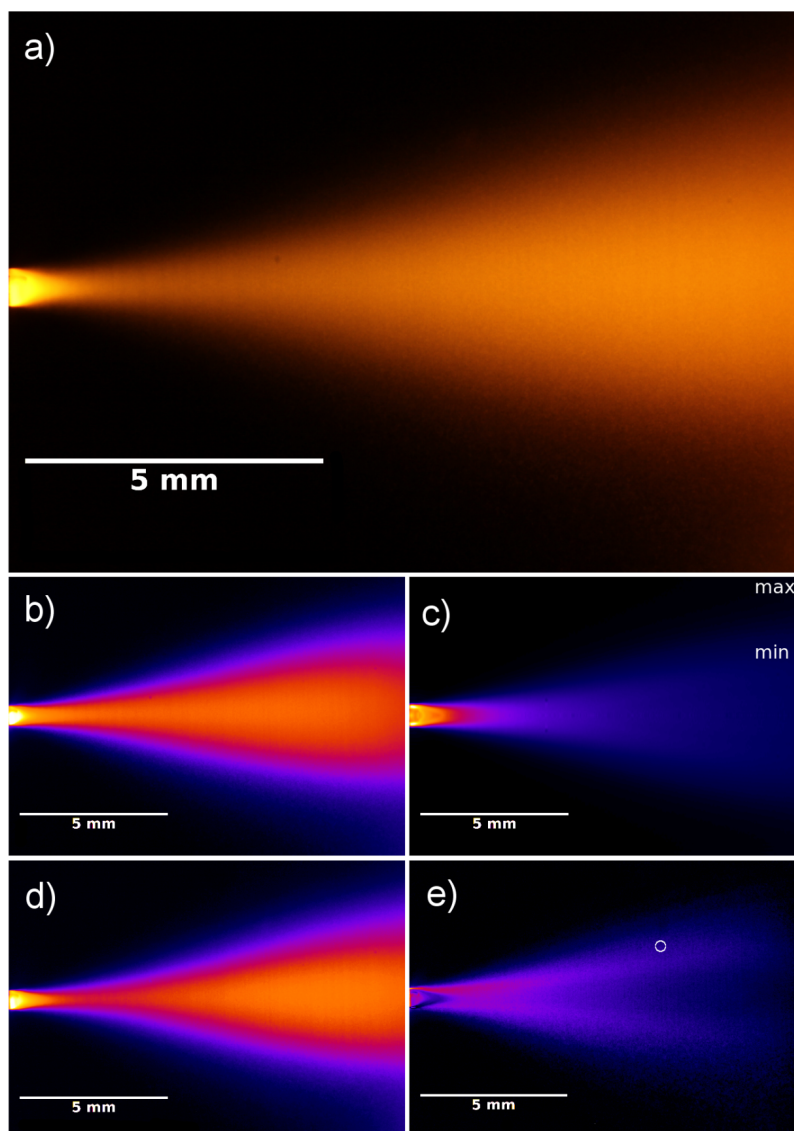


Abbildung 5.8: LIF Abbildungen des SSI Sprays. a) Fluoreszenzsignal von Rhodamin B in 1:1 MeOH/H₂O akkumuliert über 2000 Pulse des anregenden Lasers; b) gesamte Fluoreszenzintensitäten Karte, dargestellt in Falschfarben, c) mittlerer Schnitt durch die rekonstruierte 3D Verteilung von b); d) gesamte Fluoreszenzintensität, gefiltert durch UV-Kaltlichtspiegel, nur Fluoreszenz über 556 nm (solvatisiertes Rhodamin B) wird detektiert; e) Differenzbildung zwischen b) und d), nur Fluoreszenz unter 556 nm (desolvatisiertes Rhodamin B) wird detektiert. Der Kreis beschreibt die Lade des Einlass in den MS Experimenten.

zur original 3D-Verteilung transformiert werden. [105]

Eine numerische Inversion der Abeltransformation wurde mit Hilfe eines MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, USA) Codes durchgeführt. Da die inverse Abeltransformation in mehreren wissenschaftlichen Veröffentlichungen bereits genutzt wurde (Vgl. Ref. [106] und den enthaltenen Zitaten), sind die mathematischen Details hier nicht angegeben. Im Grunde wird die Inversion mittels Fourier-Hankel berechnet. [107]

$$F(y) = 2 \int_y^\infty \frac{f(r)r \, dr}{\sqrt{x^2 - y^2}}. \quad (5.1)$$

Aus dieser Berechnung resultiert die 3D-Verteilung innerhalb des Spraykegels, welche in Abb. 5.8 c) als Schnitt durch den Kegel dargestellt ist. Durch die Zylindersymmetrie beinhaltet dieser meridiale Schnitt alle Informationen der originalen 3D-Verteilung der Fluoreszenz. Aus Abb. 5.8 c) ist ersichtlich, dass das Spray die Form eines gefüllten Kegels hat und die höchste Fluoreszenzintensität im Zentrum bildet. Die bloße 2D-Darstellung hätte auch aus einer hohlen Verteilung herrühren können. Dies hingegen bedeutet, dass weitere Mechanismen zu der hohen Ionenausbeute an den Rändern des Sprays beitragen müssen. Diese wurden bei einem etwa 3 mm Versatz vom Sprayzentrum detektiert.

Rhodamin B hat einen ausgeprägten Solvatochromismus. [108] Beim Lösen von Rhodamin B werden die energetische Position des S_0 Grundzustandes und des S_1 angeregten Zustandes zueinander verschoben, woraus eine Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums resultiert. Die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums des solvatisierten Rhodamins ist $\lambda = 577 \text{ nm}$ (MeOH) [109] und $\lambda = 580 \text{ nm}$ (H_2O) [108], wohingegen das Maximum des nackten Moleküls bei $\lambda = 542 \text{ nm}$ [110] liegt. Die optimale Anregungswellenlänge verschiebt sich entsprechend von $\lambda = 531 \text{ nm}$ zu $\lambda = 557 \text{ nm}$ sofern z.B. Wasser als Lösungsmittel dient. [110] Die beiden Übergänge werden durch einen für diese Wellenlängen geeigneten frequenzverdoppelten Nd:YAG

Laser bei $\lambda = 532$ nm angeregt. Eine nachgeschaltete spektral aufgelöste Detektion der Fluoreszenzverteilung im Spray hilft somit den Solvatationszustand des Moleküls zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wird ein UV Kaltlichtspiegel (Transmission bei $\lambda > 556$ nm, Reflektion $\lambda < 556$ nm) vor die Kamera eingebracht. Die durch den Spiegel detektierte Fluoreszenz entstammt somit fast ausschließlich solvatisierten Molekülen. Dies ist in Abb. 5.8 d) dargestellt. Ein direkter Vergleich mit Abb. 5.8 b) zeigt deutlich, dass die Rhodamin B Moleküle hauptsächlich solvatisiert vorliegen. Um den deutlich geringeren Beitrag zur gesamten Fluoreszenz darzustellen, kann die Differenz der Intensitäten zwischen Abb. 5.8 b) und c) bestimmt werden. Dies ist in Abb. 5.8 e) gezeigt. Dieses LIF-Bild zeigt die Fluoreszenz unterhalb $\lambda = 556$ nm, z.B. Licht, was von desolvatisierten Molekülen emittiert wird. Es ist zu erkennen, dass die Desolvation der Moleküle hauptsächlich am Rande der Expansionszone stattfindet. Dies kann damit erklärt werden, dass die Beschleunigung der flüssigen Tropfen durch Venturikräfte stattfindet, welche in den äußeren Regionen der Düse wirken. Dies könnte zu einer stärkeren Beschleunigung der Tropfen in den äußeren Regionen der Düse führen. Eine detailliertere Erklärung bedarf jedoch weiterer Experimente. Ein Vergleich zwischen Abb. 5.8 d) und e) zeigt deutlich, dass innerhalb der gesamten Expansionszone die meisten Moleküle solvatisiert vorliegen. Dennoch sind keine Lösungsmittelcluster in den MS Spektren zu sehen. Dies lässt auf einen nachfolgenden Desolvatisierungsprozess im Massenspektrometer selbst schließen. Es kann angenommen werden, dass das Aufheizen des Gasstromes die Effektivität der Desolvation und somit der Ionisation deutlich erhöhen würde. In den durchgeführten Experimenten wurden bisher jedoch keine geheizten Gasströme oder Einlässe verwendet. Der eigentliche Bildungsprozess der detektierten, desolvatisierten Ionen ist noch unklar. Am plausibelsten ist eine Verdampfung des Lösungsmittels in der ersten Pumpstufe des Interfaces zwischen AP und dem Hochvakuum im Analysator durch den relativ erhöhten Dampfdruck des Lösungsmittels. Da die Solvation der gebildeten Ionen die Spektren beeinflusst [111, 112], müssten weitere Studien entlang der ein-

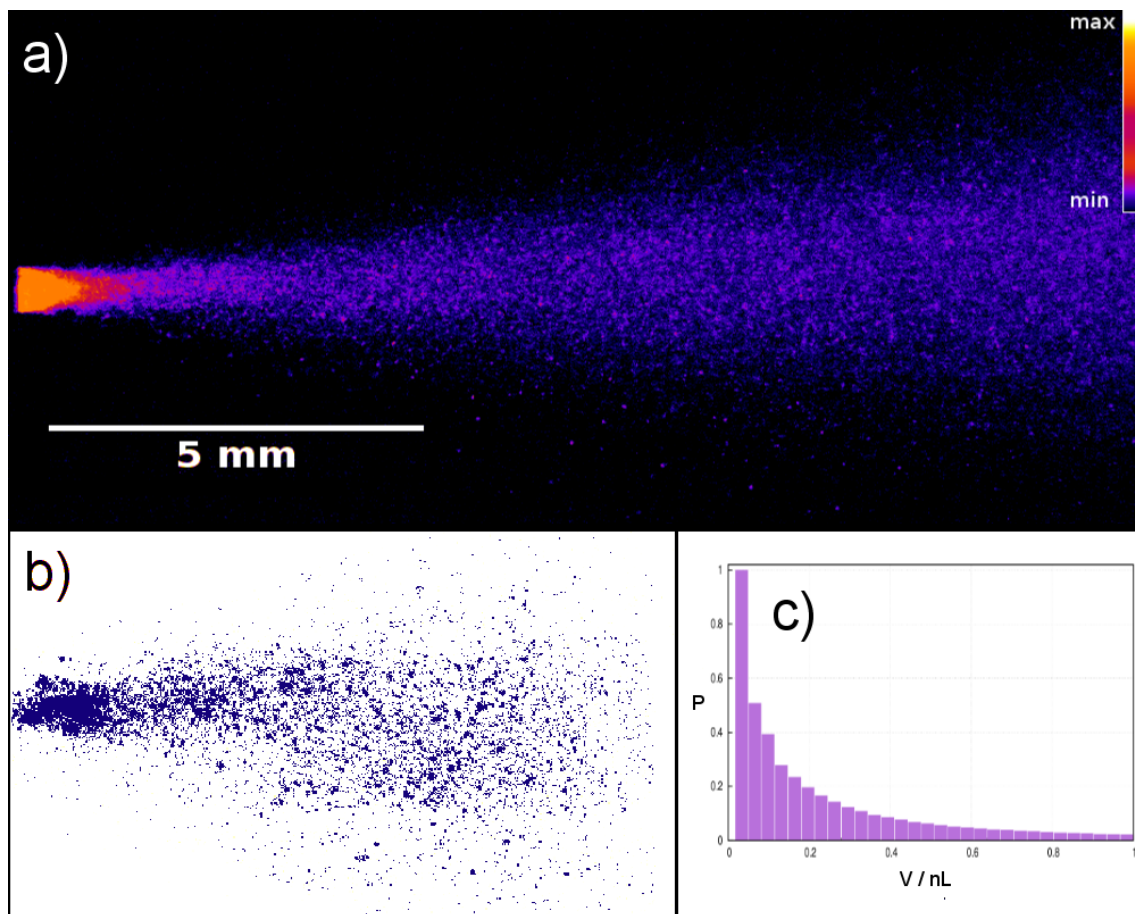


Abbildung 5.9: Einzeltropfenuntersuchungen: a) Mehrfache Belichtung des Spraykegels in Falschfarbendarstellung; b) einzelne Belichtungen des Kegels, Darstellung der Tropfenverteilung in x,y-Ebene; c) Histogramm der Tropfen/Volumen-Verteilung.

zelen Pumpstufen durchgeführt werden.

Ein anderer Ansatz um einen tieferen Einblick in die Desolvations- und Ionisationsprozesse von einzelnen Mikrotropfen zu erhalten, sind mesoskopische Studien. Um Informationen zur Tropfengrößenverteilung und deren Geschwindigkeiten zu erhalten, werden weitere Experimente durchgeführt. Dafür wird der für die Visualisierung des Sprays verwendete Aufbau genutzt. Zur Identifikation einzelner Tropfen wird die Repetitionsrate des Anregungslasers auf 20 kHz erhöht und die Belichtungszeit der Kamera auf 1/1024 s eingestellt. Das mit diesen Ein-

stellungen erhaltene Bild ist in Abb. 5.9 a) dargestellt. Es zeigt verschiedene Einzeltropfen, die mehrfach belichtet wurden. Durch die Identifikation einzelner Tropfen kann deren Geschwindigkeit auf Grundlage der Trajektorien berechnet werden. Alle beobachteten Tropfen bewegen sich mit einer Geschwindigkeit im Bereich $20\text{-}40\text{ m s}^{-1}$. Diese Ergebnisse stimmen mit früher veröffentlichten Arbeiten zu diesem Thema überein, welche von $15\text{-}55\text{ m s}^{-1}$ ausgehen. [99] Die Geschwindigkeit für das sich ausdehnende Gas kann, der Gleichung für eine adiabatische Ausdehnung gegen den Atmosphärendruck folgend, berechnet werden: [87, 113]

$$P = [1 + 0.5(\gamma - 1)Ma^2]^{\gamma/(\gamma-1)} \quad (5.2)$$

wobei γ die Wärmekapazität von Stickstoff darstellt. Der genutzte Stagnationsdruck von 2 bar führt zu einer Gasgeschwindigkeit von ≈ 1 Mach. Dies bedeutet, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit etwa der Schallgeschwindigkeit entspricht, wobei die durch Venturikräfte beschleunigten Lösungsmitteltropfen eine Endgeschwindigkeit von etwa dem Faktor 25-50 weniger aufweisen.

Um den Vernebelungsprozess besser zu verstehen, ist es wichtig die Tropfengröße zu bestimmen. Dazu wurden Einzelbelichtungen aufgenommen. Dies wurde durch eine Senkung der Repititionsrate des Lasers auf 1 kHz erzielt, was in etwa der Belichtungszeit der Kamera bei $1/1024\text{ s}$ entspricht. Die dabei erhaltenen Aufnahmen werden durch eine Hintergrundsubtraktion so bearbeitet, dass nur noch einzelne Tropfen als binäres Datenset zu sehen sind, welches durch einen Schwellenwert im Programm (ImageJ, National Institutes of Health, USA) festgelegt ist. Ein Beispiel ist in Abb. 5.9 b) abgebildet. Im Anschluss wird mit ImageJ ein Programm gestartet, welches automatisch die Tropfengröße analysiert. Um statistisch sichere Werte zu erhalten wird diese Prozedur so lange durchgeführt, bis 350.000 Mikrotropfen ausgewertet sind. Die daraus resultierende Tropfengrößenverteilung ist in Abb. 5.9 c) gezeigt. Unter der Annahme einer sphärischen Geometrie, kann die Tropfengröße Informationen zu deren Volumen (siehe Abb. 5.9 c) horizontale Achse) geben. Die Größenverteilung folgt einem exponentiellen Abfall

mit einem Maximalvolumen von 30 pL. Dies korreliert mit einem Tropfendurchmesser von etwa 3,2 μm . Dieser Wert entspricht der räumlichen Auflösung der Kamera, was bedeutet, dass auch kleinere Tropfen gebildet werden könnten. Diese Ergebnisse reihen sich zwischen den Resultaten der Stroboskop Experimente von Zilch *et al.* (10 μm) [99] und den Erkenntnissen aus aerodynamischen Partikelgrößenbestimmungen (0,8 μm) [100] ein. Die letztgenannte aerodynamische Studie zeigt eine bimodale Partikelgrößenverteilung mit den Maxima bei 0,7 und 0,9 μm im Durchmesser. Da dieses unterhalb der räumlichen Auflösung liegt, kann keine direkte Vergleichbarkeit hergestellt werden. Zilch fand eine monoexponentielle Verteilung mit einem Maximum bei einer Tropfengröße von 10 μm im Durchmesser. [99] Jedoch wurde die maximale Auflösung der verwendeten Kamera in dieser Veröffentlichung nicht angegeben. Es ist somit unklar ob die Verteilung durch experimentelle Artefakte oder unterschiedliche Expansionsbedingungen entsteht. Generell kann gezeigt werden, dass die hier publizierten Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den vorherigen Arbeiten anderer Gruppen stehen. Dies bestätigt die Annahme, dass die genutzte Airbrush Pistole mit SSI-Quellen vergleichbare Ergebnisse liefert.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Um die SSI in eine standardisierte Anwendung zu führen, wurde eine kostengünstige *Sonic Spray Ionisations*-Quelle vorgeschlagen. Diese ist bereits kommerziell erhältlich und kann daher in Zukunft für direkt vergleichbare Experimente in unterschiedlichen Laboren verwendet werden. Einzelne Analyten, wie einfache Aminosäuren bis hin zu kleinen Proteinen, konnten bereits erfolgreich analysiert werden. Zur Charakterisierung der Spraybildung und der Ionisation im vorgeschlagenen Aufbau sind LIF-Experimente durchgeführt worden. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendete Airbrush zu direkt vergleichbaren Ergebnissen mit anderen SSI-Quellen führt. [91, 99] Zum ersten Mal wurde eine Desolvatation von Ionen im SSI-Spraykegel mittels Solvatochromie-LIF Experimenten beobachtet. Es wurde gezeigt, dass die

Bildung nackter Ionen im frühen Stadium der Sprayexpansion und bevorzugt in den äußeren Bereichen stattfindet. Die Mehrheit der Ionen im Spraykegel sind jedoch weiterhin solvatisiert. Dies zeigt, dass die Desolvatation hauptsächlich in den ersten Pumpstufen des AP-MS-Interface stattfindet. Symmetrische Annahmen erlauben die Rekonstruktion des Sprays in ein 3D-Modell der räumlichen Verteilung. Beobachtungen einzelner Tropfen ermöglichten es die Tropfengröße sowie deren Geschwindigkeit innerhalb des Sprays zu bestimmen. Die eingeführte SSI-Quelle kann zukünftig eine Anwendung als zuverlässige Ionisationsquelle finden.

Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass eine große Anzahl von kleinen Tropfen zu einer sehr effizienten Ionisation führt. Dies ist gerade für eine Sprayionisationstechnik aus einem akustisch levitierten Tropfen wie z.B. bei der LDI von enormer Bedeutung. [114] Es muss also notwendigerweise für eine Ionisation aus einem Tropfen heraus ein Spray generiert werden, dass möglichst kleine Tropfen erzeugt. Die Laserdesorption ist somit eine der Möglichkeiten dies zu realisieren. Die Prozesse im Spray können besser nachvollzogen und so die Anwendbarkeit der Methoden im HTS/TAS vorangetrieben werden.

Kapitel 6

Field Induced Droplet Ionisation Assisted by Ultra Sound

Die Ergebnisse dieses Kapitels finden sich auch in der Publikation in Review of Scientific Instruments, Rev. of Sci. Instr., 2017, 88 (10), 105108.

DOI: <https://doi.org/10.1063/1.5004046>

6.1 Field Induced Droplet Ionization

Bei der Wechselwirkung zwischen Tropfen und elektrischen Feldern treten Phänomene auf, die in der Literatur bereits ausführlich dargelegt wurden. [115, 116, 117] Diese Veröffentlichungen basieren alle auf den Entdeckungen von Lord Rayleigh, welcher postulierte, dass nur eine bestimmte Ladungsmenge in einem einzelnen Tropfen vereint sein kann. [118] Bei einer Überschreitung dieser kritischen Anzahl von Ladungsträgern gleicher Polarität konnte er beobachten, dass die Abstoßungseffekte im Tropfen zu einer sogenannten Coulomb-Explosion führen. Daher wird dieser obere Grenzwert der Ladungsdichte als Rayleigh-Limit bezeichnet. Oberhalb dieses Grenzwertes übertreffen die starken elektrostatischen Kräfte vereinzelter Ladungsträger die verhältnismäßig schwachen Van-der-Waals-Wechselwirkungen der Lösungsmittelmoleküle untereinander. Bei dieser, durch die sich abstoßenden Coulombkräfte der einzelnen Ladungsträger untereinander hervorgerufenen, Explosion entstehen viele kleinste Tropfen, welche ein Gas/Flüssig-Aerosol ausbilden. Je nach Polarisierbarkeit des Lösungsmittels können auch Tropfen ohne ursprüngliche Nettoladung im elektrischen Feld geladen werden und schließlich zerbersten. Durch den langsamen Prozess der Ladungsdiffusion findet dieser Vorgang jedoch auf wesentlich längeren Zeitskalen statt als der von Tropfen, die bereits eine Ladung tragen. Je länger sich die polarisierbaren Tropfen im Feld befinden, desto mehr positive und negative Ladungsträger werden voneinander getrennt und an den jeweils gegenüberliegenden Enden der Tropfen akkumuliert.

Grundsätzlich geschehen diese Prozesse auch bei der ESI. [47] Diese Technik unterscheidet sich jedoch in der Tatsache, dass die Ladungsseparation nicht in einem einzelnen Tropfen geschieht, sondern innerhalb einer Kapillare und einer separaten Elektrode, welche dem Ende der Kapillare gegenüber angebracht ist. Ein weiterer Unterschied ist, dass bei der ESI eine Polarität der Ladung an der anliegenden Elektrode direkt abgeführt wird, da diese im elektrisch leitfähigen Kontakt zur Probe steht. Dennoch haben beide Ansätze gemeinsam, dass ein Spraykegel an den Enden der Kapillare bzw. am Ende eines Tropfens gebildet wird, wo die hohe Dichte

an Ladungsträgern das Rayleigh-Limit erreicht. Der dabei gebildete Spraykegel, gefolgt von einem Zerfall in viele kleinste Tropfen ist bekannt als „Taylor-Cone“. [119] Der Zerfall kann chaotisch spontan verlaufen oder es kann versucht werden ihn gezielt zu induzieren und somit möglichst kontrolliert ablaufen zu lassen, um eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen. Dies ist beispielsweise erforderlich, um den Effekt für analytische Techniken auszunutzen. [120, 121]

Neben ESI und anderen Techniken, welche diese Spraybildung nutzen wie z.B. sondenbasierte Probe Electro Spray Ionization, PESI, [122] oder Paperspray Ionization, [123] findet dieser grundlegende Prozess auch bei der Feld-induzierten Tropfen Ionisation Massenspektrometrie (engl. *Field induced droplet ionization*, FIDI) [15] Anwendung. Diese Technik besitzt das Alleinstellungsmerkmal, dass der Analyt nur bei dieser Technik, in der die Ladungstrennung alleine durch das Anlegen eines externen elektrischen Felds induziert wird und nicht durch unmittelbaren Kontakt zu einer Elektrode, berührungslos abgefragt werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist dieser Ansatz daher von besonderem Interesse. Diese Methode beruht darauf, dass aus einem Tropfengenerator fallende μm große Tropfen produziert werden und ein sehr starkes elektrisches Feld ($2,2 \cdot 10^6 \text{ Vm}^{-1}$) passieren. Im Feld werden die im Tropfen vorhandenen Ladungsträger separiert und bilden an beiden Seiten des Tropfens feine Tropfenjets aus. Diese Jets bestehen aus kleinsten Tropfen, die durch verdampfendes Lösungsmittel und gemäß Charge-Residue-Modell nackte Ionen auf dem Weg zum MS ausbilden. Das benötigte elektrische Feld wird zwischen zwei parallelen Plattenelektroden aufgebaut, wobei eine der beiden Platten eine zentrale Bohrung besitzt, welche als Einlassöffnung zum MS dient. Die zwischen den Plattenelektroden generierten Tropfen können entlang des Druckgradienten in das Massenspektrometer überführt und schließlich analysiert und detektiert werden. Es war bereits möglich Cytochrom c ($m/z \approx 12 \text{ kDa}$) mit Hilfe dieser Technik zu detektieren. Seit der Einführung dieser Methode durch Grimm und Beauchamp im Jahr 2003 hat die Gruppe weitere Grundlagenforschung betrieben, um ein besseres Verständnis des Tropfen-Ionisation-Verhaltens zu erhalten

und um das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern. [124, 125, 126] In der letztgenannten Publikation wurde der fallende Tropfen durch einen an einer Kapillare hängenden Tropfen ersetzt. Dieser wird ebenfalls zwischen zwei Platten angebracht, wobei eine der Platten erneut den Einlass zum MS darstellt. Ein hängender Tropfen verbessert Faktoren wie Stabilität, Reproduzierbarkeit oder Sensibilität der Methode, opfert jedoch die Vorteile einer kontaktlosen Abfrage. Durch eine Ladungsseparation innerhalb eines hängenden Tropfens kann der Mechanismus immer noch einem FIDI-Prozess zugeschrieben werden. Jedoch erinnert diese Technik eher an eine an beiden Seiten stattfindende ESI, da zusätzlich Spannung am Tropfen angelegt wird.

Im Hinblick auf eine kontaktlose Probenhandhabung ist der hängende Tropfen ein Rückschritt verglichen mit dem fallenden Tropfen. Durch die inhärenten Vorteile einer kontaktlosen Analyse, vereinigt mit den Vorteilen statischer, d.h. nicht fallender Tropfen, wäre eine Kombination eines akustisch levitierten Tropfens an ein polarisierendes, starkes elektrisches Feld eine wünschenswerte Abfragetechnik für flüssige levitierte Proben in der Massenspektrometrie. Eine solche Technik, die die Vorteile der Levitation mit der Feld-induzierten Tropfen Ionisation vereint, wird in diesem Kapitel eingeführt. Diese Technik wird als *Field Induced Droplet Ionization Assisted by Ultra Sound* (FIDIBUS) bezeichnet. Im Gegensatz zu den bei der FIDI genutzten fallenden Tropfen [15, 121] können mehrere zeitlich auseinanderliegende Experimente nun auch nacheinander an einem einzigen Tropfen durchgeführt werden, der theoretisch zeitlich unbegrenzt in der selben Position verbleiben kann. Später erlaubt dieser Ansatz durch die Möglichkeit schnell aufeinanderfolgende Experimente unter identischen Bedingungen vorzunehmen auch eine Optimierung der physikalischen Parameter in Hinsicht auf die Prozesskenngrößen wie Ionenausbeute und Stabilität. Eine weitere Verbesserung besteht darin, dass nun der Tropfen exakt im elektrischen Feld positioniert werden kann und an dieser charakteristischen Position verbleibt. Im Vergleich zum fallenden, d.h. räumlich transienten Tropfen, ist

der statisch levitierte Tropfen somit immer dem gleichen Ausschnitt des räumlich anisotropen elektrischen Feldes exponiert. Daher ist es nun möglich die Elektrodengeometrie so zu optimieren, dass für die Tropfenjetbildung, der folgenden Spraykegelbildung und schließlich für die Tropfen/Ionentransmission in das MS möglichst optimale Parameter gefunden werden können. Nicht nur das elektrische Feld, sondern auch das akustische Feld müssen zusätzlich an die neuen Anforderungen angepasst werden. Die aus dem ursprünglichen Tropfen gebildeten kleinen Tropfen sollen durch die vorherrschenden Kräfte im Levitator nicht zurück in den Druckknoten transportiert werden, sondern gelangen entlang des Druckgradienten in das Massenspektrometer. Daher ist es wichtig das akustische Feld zu fokussieren, um schmalere Druckknoten zu erhalten. Dadurch, dass der Tropfen nicht komplett verbraucht wird, kann so eine mehrfache Informationsabfrage aus einem Tropfen erfolgen.

6.1.1 Vorteile bei der Einbindung in ein Totalanalysesystem

Aus der elektrostatischen Kopplung des akustisch levitierten Tropfens ergeben sich zwei wesentliche, technische Vorteile für die Implementierung in ein Totalanalysesystem:

- i) Der Platzverbrauch für einen etwaigen Laser, wie er in der LDI verwendet wird, kann durch den Einsatz von Ringelektroden am Tropfen drastisch verringert werden. Durch den Wegfall eines Lasers zur Ionisation können zudem Kosten gespart werden und das System ist weniger anfällig für Störungen, durch z.B. Erschütterung, da der Laser u.U. erneut justiert werden müsste. Auch die Eigenbewegung des Tropfens hat geringere Auswirkungen bei dieser Methode, da er durch das Anlegen elektrischer Felder in seiner Position stabilisiert wird. Die notwendige Elektronik wird auf kleinem Raum gebaut und trägt zur einer kompakten Form des Instrumentes bei.
- ii) Durch die Substitution des Lasers können Sicherheitsbedenken gegenüber dessen kohärenter Strahlung umgangen werden. Diese Instrumentation entspricht zunächst keiner Laserklasse mehr und bedarf so keiner gesonderten Schulung der Laborangestellten. Dadurch dass sehr

schnell ein Spektrum generiert werden kann, trägt dieser Aufbau, über die technischen Merkmale hinaus, dazu bei einen effizienten Analysedurchsatz zu generieren. Sofern dies in ausreichender Schnelligkeit möglich ist, kann diese Technik durch die kontaktlose Probenhandhabung in TAS- und den damit verbundenen Vorteilen anwendungsorientiert auch in HTS-Studien eingesetzt werden.

6.2 Experimenteller Aufbau

Der Aufbau ist in Abb. 6.1 schematisch dargestellt und setzt sich vereinfacht aus dem akustischen Levitatorsetup, den für die FIDI verwendeten Elektroden und dem bereits in anderen Kapiteln beschriebenen HToF zusammen. Der Levitator selbst ist bereits im Kapitel 4.4 beschrieben worden und besteht aus einem Schallkonverter (40 kHz, MTH, Henstedt-Ulzburg, Deutschland), einer Sonotrode und einem Reflektor im Abstand von $5/2 \lambda$. Im abgebildeten Aufbau sind zusätzlich zwei Ring- und eine Nadelelektrode zu sehen. Die Ringelektroden (0,5 mm Drahtdurchmesser, 1 cm Elektrodendurchmesser) repräsentieren in dieser Darstellung die essentiellen Feldelektroden, d.h. das Elektrodenpaar, zwischen dem das elektrische Feld ausgebildet wird. Die Nadelelektrode ist ein optionaler Bestandteil der FIDIBUS. Um starke elektrische Felder aufzubauen in dem sich die Taylor-Cones ausbilden können, werden Netzteile mit hohen Ausgangsspannungen verwendet. Sofern Spannungen entgegengesetzter Vorzeichen von je max. 5 kV an die jeweiligen Ringelektroden angelegt werden, sind zwei Netzteile (PS 350, Stanford Research Systems, Inc., USA) ansonsten ein spannungsstärkeres bis ± 12 kV (HCP 14-12500, FuG Elektronik GmbH, Deutschland) genutzt worden.

Die Tropfen einer gewählten methanolischen Analytlösung werden in den Druckknoten des Levitators injiziert. Das Volumen der Tropfen beträgt $5 \mu\text{L}$. Durch eine geringfügige Variation der Position des Reflektors wird der runde Tropfen in eine platte linsenförmige Geometrie gezwungen ($d \approx 5 \text{ mm}$), um den Radius zu vergrößern. Der Tropfen befindet sich dabei exakt

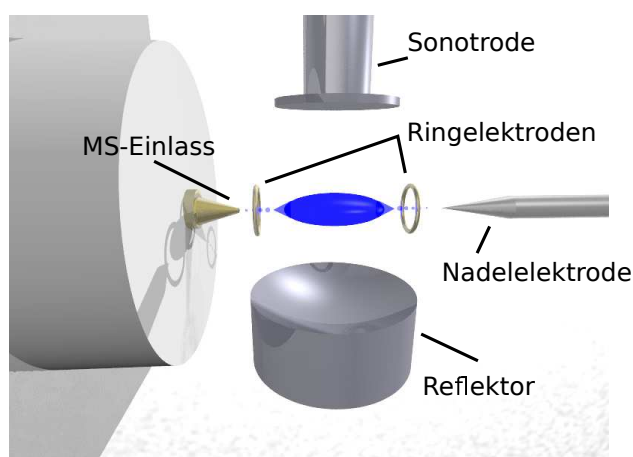


Abbildung 6.1: Experimenteller Aufbau der *Field Induced Droplet Ionization Assisted by Ultra Sound* (FIDIBUS).

zwischen den beiden Ringelektroden (Abstand 1 cm) auf gleicher Höhe mit dem Massenspektrometereinlass im Abstand von 1,5 cm. Bei der Detektion von Massenspektren im positiven Ionenmodus wird auf die näher am MS gelegene Elektrode eine negative und auf die andere eine positive Spannung angelegt. Der MS-Einlass (Vgl. Abb. 3.8) wird dabei potenzialfrei gehalten, um Überschlüge auf das Massenspektrometer zu vermeiden. Um einen guten Tropfentransfer in das Massenspektrometer zu gewährleisten, wird der Einlass mit einem Durchmesser von 200 μm gewählt. Ein 150 μm großer Einlass führte zu keinem reproduzierbaren Ergebnis und ein 300 μm Düsen einlass war zu groß, um das Vakuum im MS mit den vorhandenen Pumpsystem aufrecht zu halten. Da Methanol als Lösungsmittel verwendet wird, sollte für jede Messung ein neuer Tropfen verwendet werden, um ungewünschte Verdampfungseffekte zu reduzieren.

Verwendete Chemikalien

Als Lösungsmittel wird Methanol (> 99,9 % pure, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und Ethanol (HPLC grade, Fischer Scientific, UK) verwendet. Als Analyt wurde Salicylsäuremethylester (> 99,0 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) genutzt. Rhodamin B (Lambdachrome,

Lambda Physik, Germany) wird zur Visualisierung des Sprays genutzt. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 6.2 sind die Isopotentiallinien der elektrischen Felder mit dem Programm SimIon (Scientific Instrument Services, Inc., USA) simuliert worden. Diese repräsentieren die orts aufgelöste Feldstärke in denen die FIDIBUS-Experimente durchgeführt werden können. Isopotentiallinien sind Linien gleicher Spannung und verlaufen senkrecht zu den häufig dargestellten Feldlinien. Die gezeigten Linien entsprechen in allen Abbildungen denselben absoluten Potentialen. Eine höhere Dichte an Linien in der Darstellung entspricht daher einem steileren Potentialgradienten.

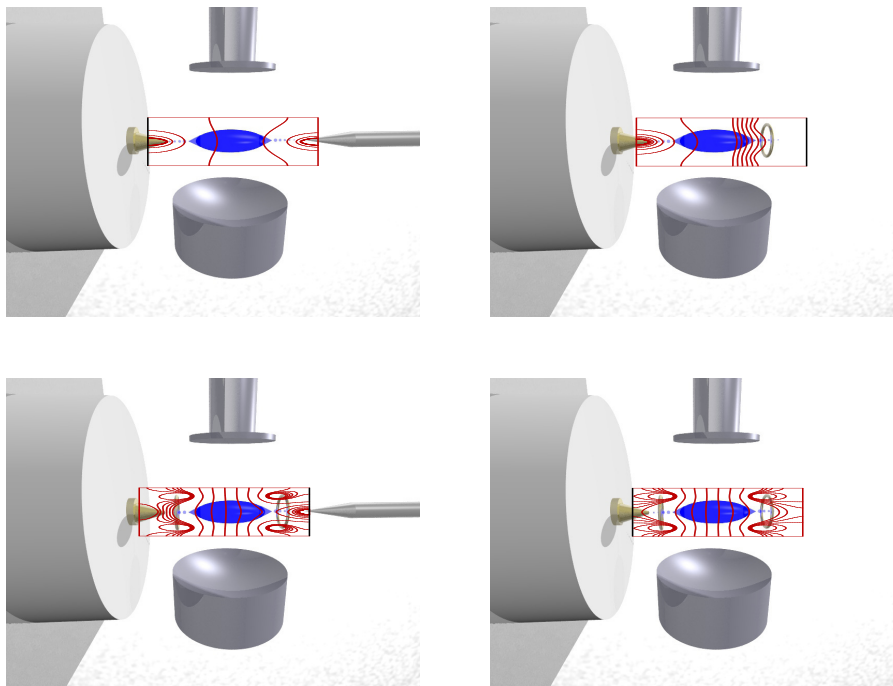


Abbildung 6.2: Simulation der Isopotentiallinien in verschiedenen untersuchten Anordnungen von Nadel- und Ringelektroden für ein FIDIBUS Experiment. Nadel/Nadel (o.l.), Nadel/Ring (o.r.), Ring/Ring inkl. Corona-Nadel (u.l.), ohne Corona-Nadel (u.r.). Die Isopotentiallinien geben den Gradienten des elektrischen Feldes an $\Delta U = 9 \text{ kV}$.

Damit eine Ladungsseparation zur Ausbildung eines Sprays führt, müssen die intramolekularen Wechselwirkungen des Lösungsmittelverbundes überschritten werden. Dazu muss das gewählte elektrische Feld stark genug sein, um das Rayleigh-Limit zu erreichen, welches für einen Tropfen durch den kritischen Wert E_c^0 beschrieben werden kann. Dieser Wert lässt sich aus folgender Gleichung berechnen:

$$E_c^0 \approx c \sqrt{\frac{\sigma}{2\pi\epsilon_0 d}} \quad (6.1)$$

mit einer empirischen Konstante $c = 1,625$, der Oberflächenspannung σ und der Dielektrizitätskonstante ϵ_0 , sowie dem Tropfendurchmesser d . [127] Der für den FIDIBUS-Prozess relevante Stoffparameter ist somit zunächst die Oberflächenspannung. Zur Minimierung des Risikos von elektrischen Überschlüssen sollte bei der Wahl der angelegten Spannung darauf geachtet werden E_c^0 so gering wie möglich zu halten. Um dies zu erreichen, gibt es zwei mögliche Variablen in der Gl. 6.1: *i.*) zum Einen könnte der Radius beliebig groß gewählt werden, wobei dies bei der aktuell verwendeten Falle nicht praktikabel ist. Dieses Problem kann jedoch durch ein Stauchen des Tropfens umgangen werden und vergrößert so den Durchmesser ohne dabei die stabile Levitation einbüßen zu müssen (s. Gl. 6.1). Diese Eigenschaften sind bereits berücksichtigt worden, weshalb hier ein Tropfen gewählt wurde, der im Verhältnis zu den Publikationen von Grimm um etwa zehn Größenordnungen voluminöser ist. *ii.*) Zum Anderen ist es möglich ein Lösungsmittel mit möglichst geringer Oberflächenspannung zu nutzen. Als gängige Lösungsmittel stehen z.B. Methanol ($\sigma = 0,023 \text{ Nm}^{-1}$) oder Ethanol ($\sigma = 0,022 \text{ Nm}^{-1}$) zur Verfügung. Wasser ($\sigma = 0,072 \text{ Nm}^{-1}$) wäre aufgrund der sehr hohen Oberflächenspannung eher ungeeignet.[128] Da jedoch in der Massenspektrometrie protonierte Molekülonen nachgewiesen werden, d.h. eine vollständige Desolvatation erfolgen muss, sollte zumindest hierbei berücksichtigt werden, dass der Dampfdruck von Methanol (13,02 kPa) deutlich über dem von Ethanol (5,95 kPa) liegt. Methanol verdampft sehr zügig, was bei zu langer Lagerung im Tropfen zu einer Aufkonzentration und somit zu veränderten Signalintensitäten führt.

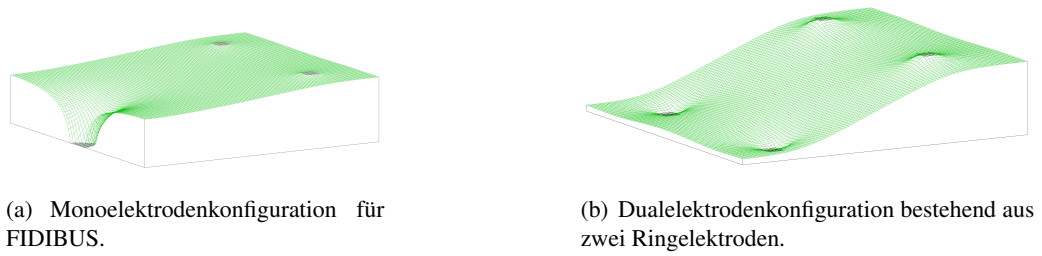


Abbildung 6.3: Simulation der Potentialfläche zwischen den Elektroden bei einer Potentialdifferenz von $\delta U = 9 \text{ kV}$.

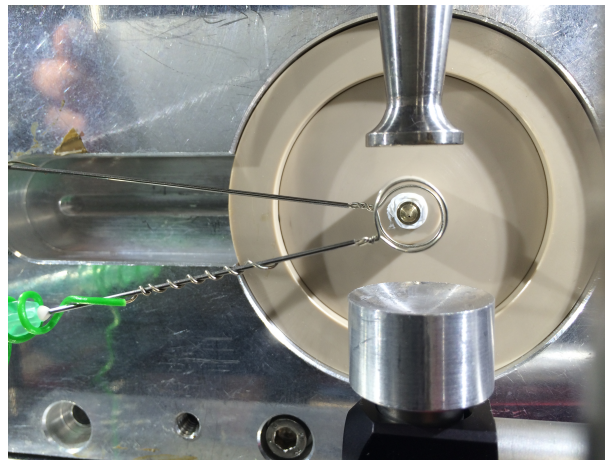


Abbildung 6.4: Dualringkonfiguration für die Analyse mit FIDIBUS.

Wie bereits von Grimm *et al.* im Jahr 2005 beschrieben, bedarf es einer gewissen Zeit, die der Tropfen im elektrischen Feld benötigt, um bei Überschreiten von E_c^0 seitliche Tropfenjets auszubilden. [124] Sobald der fallende Tropfen in das elektrische Feld eintritt, beginnt er mit v_E zu oszillieren und erst nach kurzer Zeit bilden sich die Tropfenjets bei $v_{E_c}^0$. Wird beispielsweise ein Methanoltropfen der Größe $225 \mu\text{m}$ in einem Feld von $2,18 \cdot 10^6 \text{ Vm}^{-1}$ eingebracht, dauert es $650 \mu\text{s}$ zur Ausbildung von Tropfenjets, hingegen werden bei $2,46 \cdot 10^6 \text{ Vm}^{-1}$ nur noch $350 \mu\text{s}$ zur Jetbildung benötigt. Bei den durchgeführten Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass lediglich das elektrische Feld, der Druckgradient des MS-Einlasses und die Schwerkraft auf den Tropfen wirkt.

Sobald diese Methode hingegen für die akustische Levitation adaptiert wird, muss das Schall-

feld des Levitators mit in die Betrachtungen einfließen. Neben den positiven Auswirkungen auf die Tropfengröße verhindert bzw. erschwert eine Rückstellkraft die Transmission von kleinen Tropfen in das Massenspektrometer. Somit müsste in die bisherige Gl. 6.1 ein zusätzlicher Faktor für die aufzubringende Kraft entgegen dem Schalldruck eingeführt werden. Die in das akustische Feld eingebrachten Ringelektroden haben somit bei der hier dargestellten Technik eine doppelte Bedeutung. Das elektrische Feld muss stark genug sein, um eine Taylor-Cone zu bilden und überdies die Tropfen aus dem elektrischen Feld zu dem MS Einlass zu leiten. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die geladenen Tropfen und bereits gebildete Ionen gegen die angebrachten Ringelektroden geleitet und entladen werden könnten. Für das hier durchgeführte FIDIBUS-Experiment wird eine Feldstärke von etwa $9 \cdot 10^6 \text{ Vm}^{-1}$ angelegt, was im direkten Vergleich mit FIDI dem 3,5-fachem Betrag der Feldstärke entspricht.

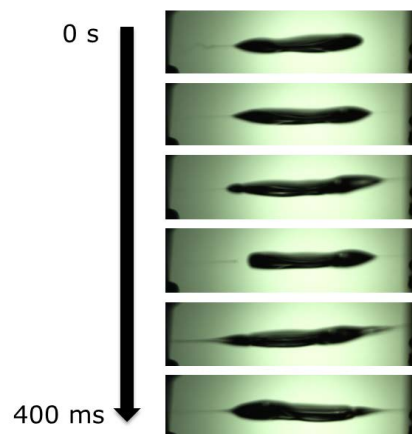
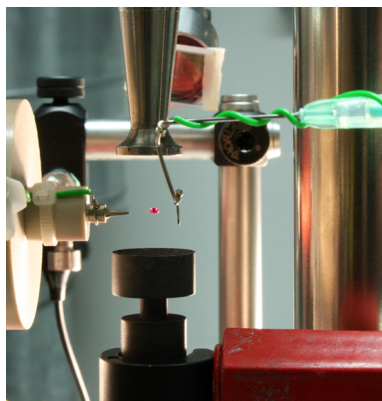
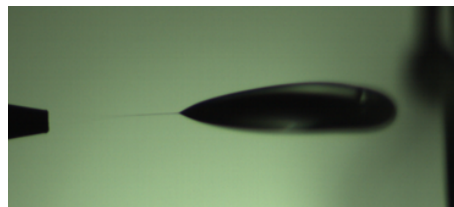


Abbildung 6.5: Zeitlich aufgelöste Oszillation eines Tropfens im akustischen Feld nach Anlegen der für FIDIBUS benötigten Spannung.

Um bei geringeren Energien, d.h. einem geringeren kritischen Wert E_c^0 arbeiten zu können, ist es auch möglich den Tropfen zusätzlich mit einer Nettoladung zu versehen. Dies kann beispielsweise mittels einer Coronaentladung realisiert werden. Solche geladenen Tropfen ermöglichen bei ähnlichen Feldern eine frühzeitigere Jetbildung und bieten gleichzeitig eine Mög-



(a) Monoelektrodenkonfiguration für FIDIBUS.



(b) Einseitige Ausbildung des Sprayprozesses.

Abbildung 6.6: Aufbau zum Generieren von einseitigen Sprayprozessen am levitierten Tropfen.

lichkeit der Absenkung des angelegten Feldes. Bei genauer Betrachtung der Bildung der Jets an den jeweiligen Tropfenenden (siehe Abb. 6.5) ist zu erkennen, dass sich nahezu immer zuerst eine Sprayconeseite ausbildet. Gemäß den Ausführungen der Gruppe um Grimm bedeutet dies, dass auf den Tropfen ausschließlich durch die manuelle Injektion mit einer Pipette eine Nettoladung übertragen wurde. Dies ist nicht ungewöhnlich, da die Verwendung von Kapillaren aus unterschiedlichen elektrischen Isolatormaterialien (beispielsweise Kunststoffe) in der Praxis sehr häufig zu einer elektrostatischen Aufladung von Lösungsmitteln führt. In solchen Fällen ist ein positiver oder negativer Ladungsüberschuss auf dem Tropfen vorhanden, was zu einer, nach einer Elektrode bevorzugten, Sprayausbildung führt. Durch eine Überkompensation beginnt eine Oszillation des Tropfens bis nach etwa 300 ms zwei Jets ausgebildet werden können. Die Möglichkeit, bei der nur ein einseitiges Spray am fallenden Tropfen generiert und verwendet wird, ist bereits von Kim *et al.* [121] ausführlich dargestellt worden. Eine sich daraus ergebende Aufbauvariante sowie die Tropfenjetbildung für FIDIBUS ist in Abb. 6.6 dargestellt.

Nach Simulation und optischer Visualisierung der Sprays wurden spektrometrische Untersuchungen unternommen. Aus der Dualringkonfiguration (s. Abb. 6.4) können Spektren wie in

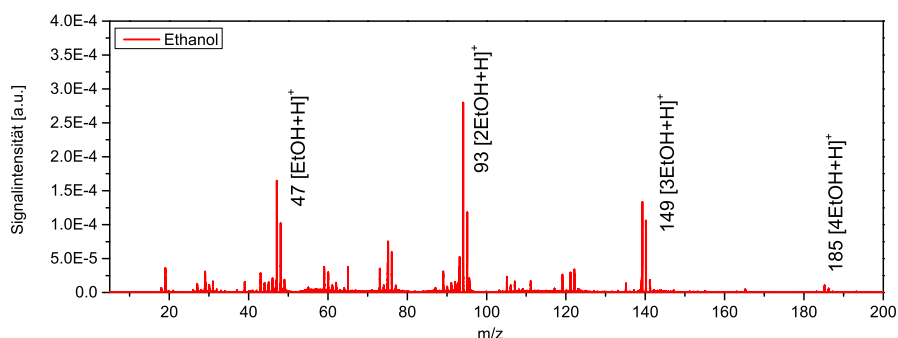


Abbildung 6.7: Massenspektrum von FIDIBUS mit 4,5 μL Tropfen Ethanol aus Doppelelektrodenkonfiguration mit $\pm 4,5$ kV.

Abb. 6.7 erhalten werden. Das Massenspektrum zeigt Signale, welche als Ethanolcluster identifiziert werden konnten und als Testanalyt fungiert. Die erhaltenen Spektren sind dominiert von Clustern der protonierten Analytmoleküle $[\text{nEtOH}+\text{H}]^+$ mit $n = 1, 2, 3, 4$. Neben den Analytclustern sind weitere Signale detektiert worden, welche z.B. Wasser zugeordnet werden bzw. einzelnen Zerfallsprodukten des Ethanols entsprechen könnten. Grundsätzlich kann der Trend aus den Kapiteln 4.4 und 5.5 auch hier aufgegriffen werden: je kleiner die Tropfen im gebildeten Spray sind, desto besser ist die Qualität der erhaltenen Spektren. Damit einhergehend zeigt sich, dass auch hier die Bildung von Clustern bei kleineren Molekülen wie Ethanol bevorzugt wird. Demnach kann man davon ausgehen, dass die erhaltenen Erkenntnisse aus LDI und SSI hier ebenfalls berücksichtigt werden müssen und allgemein vermutlich ähnliche Prozesse stattfinden. Dabei unterscheidet sich jeweils lediglich die Art wie ein Spray generiert wird.

Die Möglichkeit Spektren aus den generierten Sprays einzelner akustisch levitierter Tropfen zu erhalten, eröffnet nun den Weg für Experimente zur Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit. In Abb. 6.8 ist das zeitliche Signal für das m/z -Verhältnis, welches dem $[\text{2EtOH}+\text{H}]^+$ -Cluster zugeordnet ist, dargestellt. Es zeigt, dass beispielhaft das Signal bei m/z 65 immer in einer ähnlichen Größenordnung erhalten werden kann. Das über die gesamte Zeit gemittelte Spektrum wird in Abb. 6.7 gezeigt. Deutlich erkennbar sind die für jeden Tropfen individuell

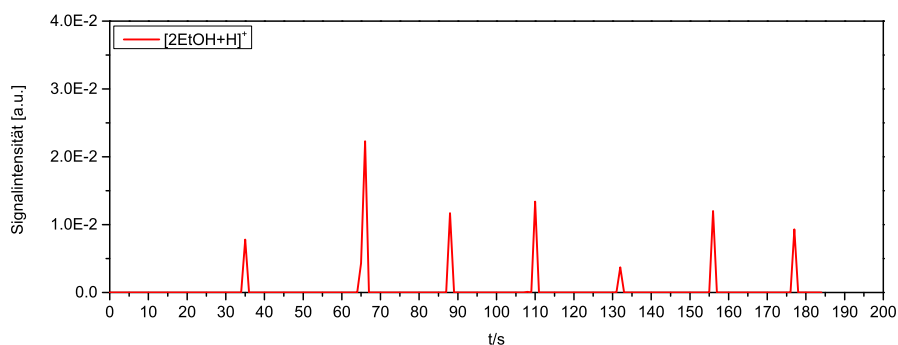


Abbildung 6.8: Zeitliche Darstellung der Reproduzierbarkeit des Signals bei m/z 65 (protonierter Ethanolcluster) bei FIDIBUS MS.

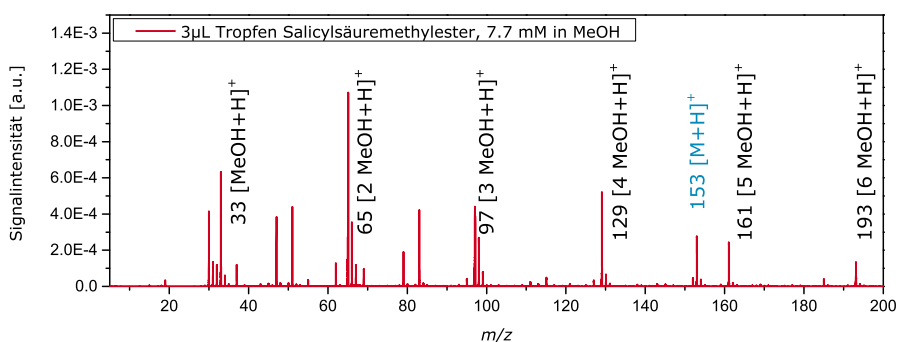
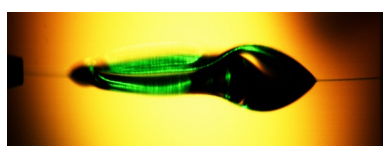


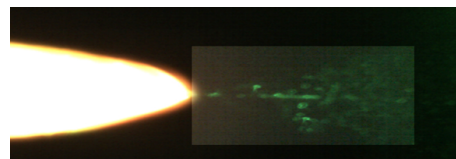
Abbildung 6.9: Erhaltenes Spektrum aus einer 7,7 mM Salicylsäuremethylester ($M = 152,14$) Methanol Lösung.

erhaltenen Signale nach jeder Injektion und anschließender Ionisation. Es zeigt, dass tatsächlich aus jedem Tropfen ein vollständiges Spektrum erhalten werden kann. Durch einen chaotischen Charakter der Spraybildung an den Enden des Tropfens kann es jedoch zu unterschiedlichen Intensitäten der Signale kommen. Dies deutet auf entweder eine Inhomogenität des elektrischen Feldes oder auf eine starke Bewegung im akustischen Feld hin. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit müssen weitere instrumentelle Veränderung ausgearbeitet werden.

Als ein Beispiel für einen mit dieser Methode bereits detektierten Analyten ist in Abb. 6.9 das Massenspektrum einer Salicylsäuremethylester-Lösung ($M = 152,14$ g/mol) gezeigt. Das Spektrum ist trotz hoher Konzentration von 7,7 mM primär von Lösungsmittelsignalen dominiert.



(a) Induzierte Jetbildung eines levitierten Tropfens mit Hintergrundbeleuchtung vor dem MS-Einlass.



(b) Visualisierung des Sprayprozesses einer Rhodamin B Lösung mittels LIF.

Abbildung 6.10: Beobachtungen des Sprayprozesses bei FIDIBUS.

Diese beschreiben das protonierte Monomer und die bekannte Clusterbildung aus sechs Monomeren. Zudem sind einzelne Hintergrundsignale detektiert worden, welche teilweise Wasser und Zerfallsprodukten des Ethanol oder auch einer unbekannten Substanz zuzuordnen sind. Vom Analyten sind konzentrationsbedingt protonierte Monomerspezies detektierbar. Beimengen von Analyten haben einen Einfluss auf die Oberflächenspannung des levitierten Tropfens. Gemäß Gl. 6.1 hat dies zur Folge, dass ein stärkeres elektrisches Feld angelegt werden muss, um diesen Effekt zu kompensieren. Da gleichzeitig der Dampfdruck erniedrigt wird, ist auch die Ionisationseffizienz erniedrigt. Diese Einschränkung könnte versuchsweise durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels umgangen werden. Methanol hat zwar eine ähnliche Oberflächenspannung wie Ethanol, jedoch könnte durch den höheren Dampfdruck auch die Ionisationseffektivität aus etwaigen gebildeten Tropfen deutlich erhöht werden.

Zusätzliche Beobachtungen des Sprayprozesses selbst aus dem Tropfen sollen beitragen die Jetbildung besser zu verstehen. Zu diesem Zweck sind LIF Experimente durchgeführt und durch eine Hintergrundbeleuchtung der Tropfenjets deutlicher hervorgehoben worden (Vgl. Abb. 6.10). Bei der Hintergrundillumination sind zwei Jets zu erkennen, welche jeweils einem Taylor Cone in Richtung positiver und negativer Ladungsverteilung entsprechen. Es zeigt, dass eine gezielte Entwicklung zweier stabiler Jets möglich ist und nicht nur eine einseitige Jetbildung gesteuert werden kann. Was darüber hinaus zu erkennen ist, ist die heterogene Verteilung der Flüssigkeit selbst. Am schmalen Teil des Tropfens befindet sich der Druckknoten,

in dem sich der Tropfen befindet. Dieser wird durch das Anlegen des Feldes aus seiner Ruhelage gebracht. Dies ist ein klassisches Phänomen, welches auf ein inhomogenes Feld oder eine schwache Exzessladung des Tropfens hindeutet. [129] Dies kann die benötigte anzulegende Spannung für eine homogene bimodale Jetbildung beeinflussen. Da dies zu Inhomogenitäten des Sprays führt, sollte dies bei Betrachtungen am Tropfen berücksichtigt werden.

Durch das Lösen von Rhodamin B in Methanol im Tropfen selbst und einer Belichtung mit einem Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$, Conquerer 3 Lambda, Compact Laser Solutions GmbH, Berlin) kann das Spray aus dem Tropfen sichtbar gemacht werden. Wie in Abb. 6.10 b) zu erkennen ist, werden kleine Tropfen aus einem großen stark fluoreszierenden Tropfen ausgeworfen. Interessanterweise fluoreszieren diese nicht. Möglicherweise wird hauptsächlich Methanol ohne bzw. mit sehr wenig Fluorophoranteil aus dem Tropfen entlassen. Dies könnte zu den sehr dominanten Lösungsmittelsignalen in den Spektren führen (Vgl. Abb. 6.9). Alternativ ist auch ein sehr schnelles Verdampfen des Lösungsmittels denkbar, so dass feste Rückstände zu der Streuung des Laserlichtes führen. Für weitere Experimente sollte in Erfahrung gebracht werden, wie die Transmission von Analyt aus dem vorgelegten Tropfen in die nächste Tropfengeneration effektiv gestaltet werden kann. Dies ist grundlegend für eine Anwendung in der Spurenanalytik. Die qualitative Betrachtung ist somit fundamental für weitere technische Entwicklungen.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte als konsequente Fortführung der von Grimm *et al.* vorgestellten Methode FIDI die *Field-induced droplet ionization assisted by ultrasound* (FIDIBUS) für die akustische Levitation adaptiert werden. Die Methode von Grimm erlaubte bereits eine kontaktlose Probenionisation aus einem fallenden Tropfen, welche nun auf die akustisch levitierten Tropfen übertragen wurde. Die Kopplung an ein Massenspektrometer ist nicht unproblematisch, da zwei entgegengesetzt wirkende Felder versuchen den Tropfen in seiner Ruheposition im Druckknoten zu belassen (akustisch) bzw. ihn heraus zu ziehen (elektrisch). Durch die entsprechende Anord-

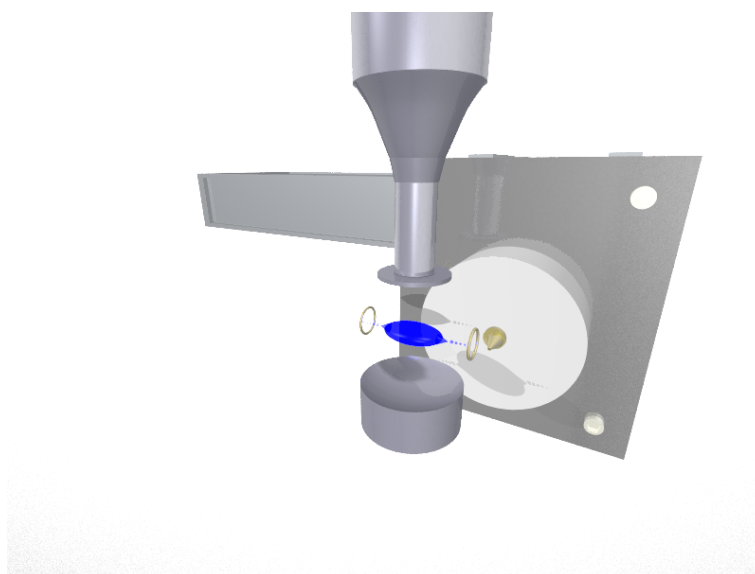


Abbildung 6.11: Orthogonal angeordneter FIDIBUS Aufbau (oFIDIBUS).

nung, Geometrie und die angelegten Spannungen der Elektroden kann jedoch eine Kopplung an das MS realisiert werden. Erste daraus resultierende Spektren sind hier präsentiert worden. Der Vergleich mit anderen Methoden am levitierten Tropfen ist schwer, da bisher nur vorgeschlagen wurde ein Spray mittels Elektrostatik aus einem Tropfen zu erzeugen. Es konnte somit die erste erfolgreiche Kopplung eines akustisch levitierten Tropfens an ein MS mittels Feld-induzierter Ionisation präsentiert werden. Die intrinsischen, bereits beschriebenen Vorteile sollten es ermöglichen zukünftig diese Methode auch für Hochdurchsatz-Screenings zur Anwendung zu führen.

Zur Verbesserung des FIDIBUS sind zukünftig diverse instrumentellen Veränderungen denkbar. Einige Hinweise auf mögliche Geometrien sind bereits von A. Cabral kurz beschrieben worden. [130] Als interessante Möglichkeit kann ein orthogonal angeordneter Aufbau analog zu ESI-Aufbauten gewählt werden (*ortho*-FIDIBUS), der den Vorteil hat, dass nur Tropfen einer bestimmten kinetischen Energie in das MS überführt werden können. Beispielsweise ändern größere Tropfen zu langsam die Flugrichtung und passieren lediglich den MS-Einlass. So kann damit der verringerte Druck im MS problemlos aufrechterhalten werden, was zu einem gerin-

geren Lösungsmiteleintrag in das MS führt. Denn ein zu schneller Druckanstieg z.B. durch eine zu hohe Transmission von Ethanol oder Methanol kann dazu führen, dass das System aus Sicherheitsgründen automatisch abgeschaltet wird. Darüber hinaus ist eine ruhigere Levitation in unmittelbarer Nähe zum MS-Einlass realisierbar, da der Sog in das MS den Tropfen nicht zusätzlich aus der Ruhelage in eine Oszillation versetzt. Des Weiteren ist eine Optimierung hinsichtlich der Elektrodengeometrie und ebenfalls eine Veränderung des Levitationsfeldes denkbar. Je stabiler der Tropfen in seiner Ruhelage fixiert ist, desto einfacher ist es Experimente zu reproduzieren und dieses somit zur gewünschten Anwendung zu führen.

Die Problematiken für die Ausbildung von Taylor Cones sind aktuell von der Gruppe um Chen aufgegriffen worden. [131] Sie beschreiben Eigenschaften der ESI unter *Super-atmospheric pressure*-Bedingungen und deren möglichen instrumentellen Lösungen. Eine einfache Möglichkeit wäre das Erhitzen von Flüssigkeiten mit hoher Oberflächenspannung. Das führt dazu, dass der Wert für z.B. σ_{H_2O} dramatisch sinkt und es als Lösungsmittel evtl. genutzt werden könnte. Es sollte zukünftig der Einfluss der Temperatur auf (physiko-) chemische Prozesse untersucht werden.

Neben instrumentellen Veränderungen ist auch eine Intervallabfrage des Tropfens vorstellbar. Durch die geschickte Schaltung der Elektroden sollte ein gezielter Strompuls zu einem steuerbaren und reproduzierbaren MS-Signal führen. Es hat zwei fundamentale Vorteile: zum Einen verhindert der gepulste Aufbau (je nach Dauer und Intensität des Pulses), dass es zu einem Überschlag zwischen den Elektroden führt. Zum Anderen kann dadurch eine wesentlich höhere Spannung angelegt werden, um eine Spraybildung auszulösen.

Kapitel 7

Positionierungsmethoden

7.1 Einleitung

Sofern methodenbedingt eine sehr geringe Ionisierungseffizienz gegeben ist oder nur sehr wenig Analyt-Moleküle vorhanden sind, kann eine Postionisation zum eigentlichen Ionisationsschritt zugeschaltet werden. Oft sind bekannte Ionisationsverfahren kombiniert, beispielsweise kann eine DESI-Quelle mit einer APCI gekoppelt werden, um die Empfindlichkeit der Analyse zu verbessern. Dies wird durch die zusätzliche Ionisation von (noch nicht ionisierten) Analytmolekülen im Gasstrom erreicht. Die Wahl einer geeigneten Kombinationen aus den unterschiedlichen, z.B. den in Kapitel 2.2 genannten Ionisationstechniken, ist sehr variabel. Befinden sich die Proben im Desorptionsschritt auf einem Trägermaterial wird bei flüssigen Matrices häufig z.B. eine Spray-Technik verwendet, wohingegen bei festen Proben oftmals eine Laserdesorption zielführend ist und somit orts aufgelöste Informationen erhalten werden. Meist bilden sich gasförmige oder zumindest fl/g oder s/g - Aerosole, die die Zugänglichkeit zu Analyten grundlegend ändern. [133, 134] Die eigentliche Postionisation folgt anschließend und kann räumlich getrennt oder nah an der Stelle der Desorption/Aerosolbildung lokalisiert werden. Dabei wird versucht eine möglichst quantitative Ionisation zu erzielen. Ein bekannter Vertreter für einen solchen Prozess ist die *Desorption Atmospheric Pressure Photoionization* (DAPPI) welche zunächst durch Spraydesorption Moleküle in die Gasphase überführt und mittels Bestrahlung durch eine UV-Lampe die Photoionisation ermöglicht. [135] Einige Sprayionisationen sind in vorangestellten Kapiteln bereits besprochen worden und können in beiden Teilen eines zweistufigen Ionisationsprozess genutzt werden. Auch eine Kombination gleicher Techniken ist möglich, z.B. kann ein Laser zur Desorption und ein weiterer zu Postionisation genutzt werden. [136]

Auf Entladungsprozessen basierende Methoden sind dabei interessante Möglichkeiten, z.B. DART und FAPA, welche sich durch ihre Geometrie unterscheiden, jedoch beide ein Plasma nutzen zur Ionisation von Analytmolekülen. Ein weiterer Vertreter ist die dielektrisch gehinderte Entladungsisolation (engl. *Dielectric Barrier Discharge Ionisation*, DBDI), welche von

Siemens [132] entwickelt und zur Erzeugung von Ozon genutzt wurde. Es ist eine flexibel einsetzbare und durch die hohe Anzahl an Ladungsträgern im Plasma effiziente Technik, welche für eine Vielzahl an Experimenten genutzt werden kann. Aufgrund dieser Eigenschaften wird in der vorliegenden Arbeit eine Postionisation mittels DBDI durchgeführt.

7.2 Plasmabasierte Postionisation

Ein Plasma entsteht dort, wo eine Energiedichte vorherrscht, die hoch genug ist, um einen Teil der erwärmten Materie zu ionisieren. Diese kann natürlichen Ursprungs sein, wenn man z.B. Blitze betrachtet, aber auch anthropogener Herkunft und wird beispielsweise als Leuchtmittel verwendet. Es besteht aus freien Ladungsträgern und Neutralteilchen, welche durch Stöße Energie in Form von Licht abgeben und so das charakteristische Leuchten erzeugt. Dadurch wird auch der als vierter Aggregatzustand bezeichnete Zustand, das Plasma, erreicht. Ein thermisch erzeugtes Plasma selbst befindet sich im quasineutralen Zustand. Doch neben einer thermischen Anregung liegen Plasmen oftmals auch abseits von thermischen Gleichgewichten vor. Solche transienten Plasmen können elektrisch oder optisch gepumpt werden. Darüber hinaus können auch Ionisationsquellen für die Massenspektrometrie auf Plasmenerzeugung beruhen. Eine der bekannten Quellen ist die APCI, bei der eine Corona-Entladung dazu führt, dass reaktive Spezies erzeugt werden, welche Ladungsträger auf die Analytmoleküle übertragen. In einem Plasma können so, durch eine kontinuierliche Energiezufuhr in das die Corona-Nadel umgebende Medium, sehr hohe Ausbeuten an zumeist protonierten Analytmolekülen erzielt werden. [48] Die benötigte Energie kann auf unterschiedlichen Wegen in ein System eingebracht werden. Bekanntermaßen kann eine hohe angelegte Spannung an einer sehr spitz zulaufenden Nadel oder Kante zu einer Entladung unter Plasmabildung führen. Die dabei stattfindenden Prozesse sind hinreichend beschrieben und verlaufen u.a. über Oxoniumionen, welche ein Proton auf den Analyten übertragen können. Bei der *Direct Analysis in Real Time* (DART) wird häufig zunächst ein Heliumatom in einen metastabilen Zustand überführt. Dieser bildet in der

Atmosphäre ebenfalls Oxonium- oder auch Ammoniumionen, welche direkt auf einen in den Gasstrom eingebrachten analythaltigen Gegenstand, z.B. ein Gitter, übertragen werden. Dort werden volatile Analytmoleküle direkt, bzw. Analyten zunächst desorbiert, in das MS transportiert, protoniert und Analytionen detektiert. [137] Diese Art der Ionisation wurde von E. Crawford bereits in Kombination mit einem Monitoringexperiment eines akustisch levitierten Tropfens genutzt. [138]

Neben den auf elektrischen Entladungen basierenden Plasmen können diese auch durch eine hohe Photonendichte erzeugt werden. Dieses Plasma kann zwei Aufgaben individuell oder simultan erfüllen. Zum Einen kann es Materie desorbieren und zum Anderen diese ionisieren. Dabei kann man Laserparameter wie die Repititionsrate nutzen, um Matrixsignale zu unterdrücken. [139] Wird ein Luftplasma vor dem MS-Einlass gezündet, können volatile Stoffe sofort ionisiert und in das MS überführt werden. [140] Wäre diese Technik mit einer Sprayionisationsmethode kombinierbar, könnte sie eine geeignete Postionisationsquelle darstellen. Hierbei ist zu beachten, dass die durch das Spray eingetragene Feuchtigkeit zu Quenching-Effekten bei der Plasmagenerierung führt.

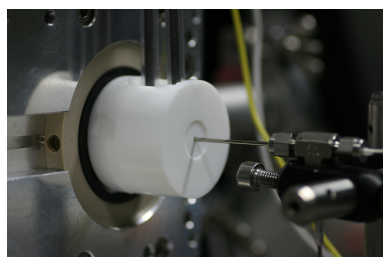
7.2.1 Dielectric Barrier Discharge Ionisation

Die DBDI wurde von der Gruppe um Zhang *et al.* [141] auf Grundlage des bereits bekannten und erwähnten [132] Phänomens eines Dielectric Barrier Discharge entwickelt und wurde erstmal als Ionenquelle für MS beschrieben. Die DBDI wurde ursprünglich eingesetzt, um beispielsweise effektiver Ozon zu produzieren [142] oder um dessen spezifische Lichtemission [143] zu nutzen. Es wird von Zhang ebenfalls, wie alle hier beschriebenen Ionisationstechniken, als Methode zur Ionisation bei Atmosphärendruck entwickelt und beruht auf Entladungsprozessen, welche zwischen zwei Elektroden entstehen, die räumlich durch ein Dielektrikum getrennt sind. Dabei wird eine Elektrode auf Masse gehalten und an die andere Wechselspannung angelegt. Das Dielektrikum kann aus unterschiedlichen Materialien bestehen. Die anzulegende

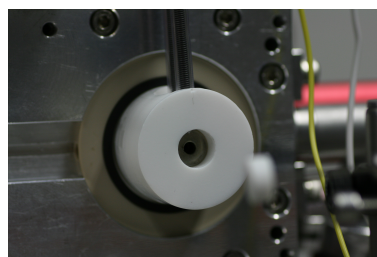
Spannung und der anzulegende Strom zur Erzeugung des Plasmas ist eine materialabhängige Größe und wird individuell bestimmt. Häufige Verwendung finden Glaskapillaren, welche mit dem gewünschten Gas durchspült werden. Dies führt zum Transport der Ladungsträger an den Ort der Desorption und Ionisation. Das gezündete Plasma wird als niedrig-Temperatur Plasma bezeichnet, da es am Kapillarenausgang eine Temperatur von unter 300 K hat. [144]

Solch ein Low-Temperature Plasma wurde bereits zur Desorption und gleichzeitigen Ionisation von Analyten verwendet. [145] Auch die Gruppe um J.T. Shelley hat diese Technik als Ionisationsmethode eingesetzt. [146] Sie verwenden jedoch eine räumlich weiter entfernte Position der Ionisation am Ende des Plasmas, weshalb der Name *flowing atmospheric-pressure afterglow* (FAPA) vergeben wurde. Die Plasmen weisen eine hohe Dichte an Elektronen, Ionen, un-/geladenen Radikalen sowie metastabilen Spezies auf, welche zur Ionisation benötigt werden. Die mit dieser Methode erhaltenen Spektren weisen sowohl Molekülionen, als auch Fragmentierung auf. Da jedoch überwiegend Molekülionen detektierbar sind, wird diese Technik dennoch den weichen Ionisationsmethoden zugeschrieben.

Im Folgenden werden zwei unterschiedliche Postionisationssysteme gezeigt. Das erste System beruht auf der speziellen *Glow Discharge Ionisation* [147], welche bei reduziertem Druck ($P \approx 10 \text{ hPa}$) durchgeführt wird und als Durchflusszelle dient. Bei dieser Technik dient die Luft als Dielektrikum. Die zweite Variante ist eine Kombination aus levitiertem Tropfen und der von Bierstedt *et al.* [148] beschriebenen DBDI-Quelle zur Post-Desorptions-Ionisation von Analytmolekülen. Alle hier genannten Ionisationsmethoden beruhen offenbar auf ähnlichen Prozessen wie der APCI [149] und führen zur Bildung von $[n\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ und NH_4^+ Ionen, welche wiederum zur Ionisation der Analyte führen. [150]



(a) Glow-Discharge-Ionisationsquelle.



(b) Innenraum der Durchflusszelle.

Abbildung 7.1: Postionisationsquelle, welche zur Ionisation durchfließender in Gasphase befindlicher Analyte genutzt wird.

7.2.2 Direkte Entladung im gepulsten Einlass

Experimenteller Aufbau der Durchflusszelle

Der Aufbau basiert auf einer vor dem Platten-Einlass angebrachten, in PTFE eingebetteten, DBDI Gas-Durchflusszelle (Maße: $\phi_{\text{au\ss en}} = 4,1 \text{ cm}$, $\phi_{\text{innen}} = 1,3 \text{ cm}$, $\phi_{\text{Ein-/Auslass}} = 0,15 \text{ cm}$). Diese ist in Abb. 7.1 zu sehen und schematisch in Abb. 7.3 dargestellt. Die Durchflusszelle besteht aus einer Kammer in die zwei O-Ringe aus Metall durch einen Abstandshalter ($\phi_{\text{innen}} = 0,4/0,6 \text{ cm}$, $L = 0,6 \text{ cm}$), ebenfalls aus PTFE, getrennt eingebracht werden. Mittels Schraubverbindungen wird einer der Ringe elektrisch geerdet, wohingegen auf den zweiten ein Potential (6 kV_{pp} , sinus, A) angelegt werden kann. Diese Zelle wird mit einem PTFE-Ring verschlossen, dessen Einlassgröße dem, der Auslassgröße entspricht. Volatile Analyten wurden aus dem Headspace eines druckfesten Zylinders ($D = 2,4 \text{ cm}$, $H = 10 \text{ cm}$) in das Massenspektrometer überführt.

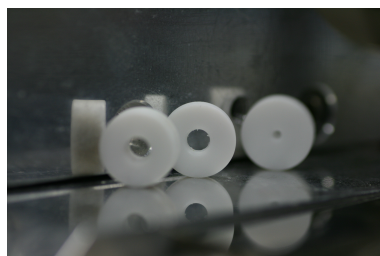


Abbildung 7.2: Elektrodenabstandshalter unterschiedlicher Innendurchmesser.

Das Plasma zündet zwischen den beiden Metallringen. Die Luft bzw. Atmosphäre unter vermindertem Druck dient hierbei als Dielektrikum. Damit verhindert wird, dass ein Überschlag auf das MS oder bereits zwischen den äußeren Verschraubungen übergeht, müssen diese isoliert werden. Darüber hinaus muss der Abstand zu dem geerdeten Ring kleiner sein, als der zum Einlass des MS. Damit kein permanentes Plasma gezündet wird, ist der Zustrom in die Kammer mit einem Magnetventil (SMC, Japan, VDW20GA) gepulst. Das Pulssignal wird mittels Delay-Generator (DG535, Stanford Research Systems Inc., USA, CA) erzeugt. Dieses wird am Einlass zur Zelle angebracht und steuert den Helium-Gasfluss (99,99 %, Linde AG; Stagnationsdruck: 0,75 bar, 0,3 Hz, 100 ms) in die Kammer. Die Ringe können in ihrem inneren Durchmesser (hier genutzt: $\varnothing_{innen} = 6 \text{ mm}$, $\varnothing_{ausen} = 13 \text{ mm}$, Länge = 3,5 mm) variiert werden, um das Volumen der Kammer zu vergrößern oder zu verkleinern. Wird analythaltiges Trägergas bzw. eine Blindprobe in die Durchflusszelle geleitet, entzündet sich das Plasma zwischen den beiden Ringen (Sinusfunktion, 100 Hz, +/- 3 kV). Das Gas samt gebildeter Ionen wird (bis sich das Ventil schließt) kontinuierlich in das Massenspektrometer überführt und kann analysiert werden. Die mit dem in den vorherigen Kapiteln verwendeten und bereits beschriebenen Flugzeitmassenspektrometer aufgenommenen Spektren resultieren aus fünf Messungen, welche innerhalb von 18 s aufgenommen wurden. Die individuellen Spektren werden dazu gemittelt.

Das anliegende elektrische Feld zwischen den beiden Ringelektroden ist konstant. Das Plasma zündet bei einer Spannung (der sogenannten Paschen-Spannung), die vom Abstand der beiden Elektroden und dem Druck des Plasmagases abhängt. Während der Abstand durch den festen Aufbau konstant ist, wird die Spannung zwischen den Elektroden nun so angelegt, dass sie bei geschlossenem Magnetventil unter der Überschlagsspannung und bei offenem Ventil über der Überschlagsspannung liegt. Somit kann durch gepulstes Öffnen des Ventils auch das Plasma gepulst werden.

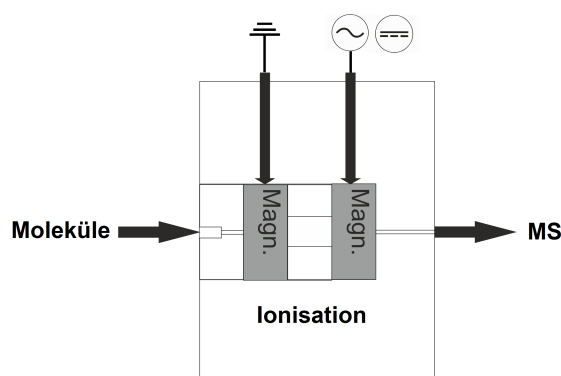


Abbildung 7.3: Schematische Darstellung der Glow-Discharge-Durchflusszelle, wobei die vordere Elektrode geerdet ist und die hintere wahlweise an Wechsel- oder Gleichstrom angeschlossen werden kann.

Verwendete Chemikalien

Als Lösungsmittel wird eine 1:1 (v/v) deionisiertes Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Aceton (> 99,9 %, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) Mischung verwendet. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet

Ergebnisse und Diskussion

Ein Massenspektrum eines durch mit Wasserdampf gesättigten Headspace ist in Abb. 7.4 dargestellt. Im Spektrum sind Cluster bis zu einer Größe von $n = 4$ zu erkennen, wobei jeweils eine Serie $\text{NH}_4^+ + n\text{H}_2\text{O}$ (m/z 18, 16, 54) und eine Serie den protonierten Wasser-Clustern (m/z 37, 55, 73) entspricht. Dabei stammen die Ammoniumionen aus der Reaktion von Stickstoff im gezündeten Plasma. Hintergrundsignale von z.B. dem Werkstück selbst ($M_{\text{PTFE, Monomer}} = 100$ Da) sind nicht zu erkennen. Jedoch sind im Bereich unterhalb von m/z 80 nicht zuzuordnenbare Signale detektiert worden. Dies bedeutet, dass trotz der Intensivierung von Analytsignalen eine sehr spezifische Abfragung von volatilen Analyten ermöglicht werden kann ohne eine starke Beeinträchtigung der Qualität der Spektren durch eine Vielzahl von systembedingten Hintergrundsignalen befürchten zu müssen. Gerade bei Desorptionstechniken besitzen die erhaltenen

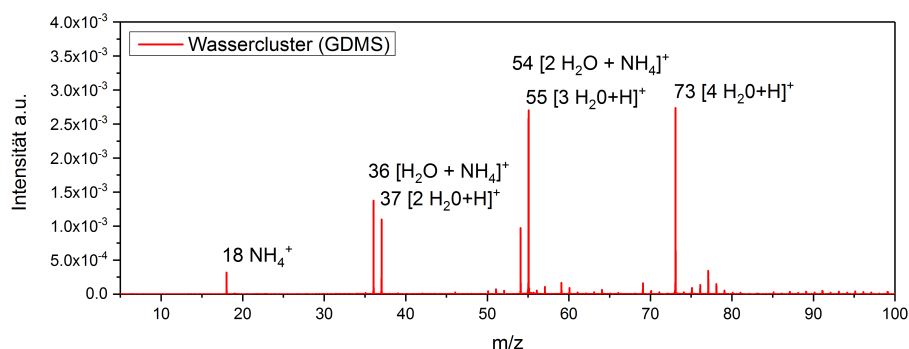


Abbildung 7.4: Erhaltenes Massenspektrum der Luftfeuchte ohne beigemengtes Aceton im Gasstrom mit Glow-Discharge-Ionenquelle.

Spektren ein starkes chemisches Rauschen, welches bereits in Kapitel 4.4 beschrieben wurde, jedoch in dieser Headspace-methode eher geringere qualitative Bedeutung hat. Bemerkenswert ist, dass sich sowohl Ammonium-Cluster als auch protonierte Wasser-Cluster ausbilden. Dies weist auf die komplexen Prozesse innerhalb eines Plasmas und der vielen möglichen Ladungsträger bzw. Ladungsübertragungen auf Analytmoleküle hin. Durch die Generierung der hohen Dichte an starken Protonendonatoren lassen sich Analyte eines Probevolumens effizienter bzw. unselektiver ionisieren und detektieren, was bei einer alleinigen Spraymethode beispielsweise zu einem nicht reproduzierbaren Ergebnis führen könnte.

Die Bildung von Clustern ist auf die erhöhte Verweildauer in der Plasmakammer und im Plasma selbst zurückzuführen. Analytionen werden mit dem Gasstrom mitgerissen und kommen in die Plasmaregion, wo sie mit den erzeugten, reaktiven Spezies zusammenstoßen. Durch das gezündete Plasma und den Gaseinstrom können Verwirbelungen entstehen, welche die Verweildauer von Molekülen auf dem Weg in das Massenspektrometer möglicherweise erhöhen und so u.U. öfter mit den reaktiven Spezies zusammenstoßen. Im MS folgt die isentropische Expansion ins Vakuum, wobei die gebildeten Cluster in dem vorher erhaltenen Zustand verbleiben und derartig detektiert werden.

Damit diese Ionisationstechnik für spätere Anwendungen in z.B. TAS genutzt werden kann,

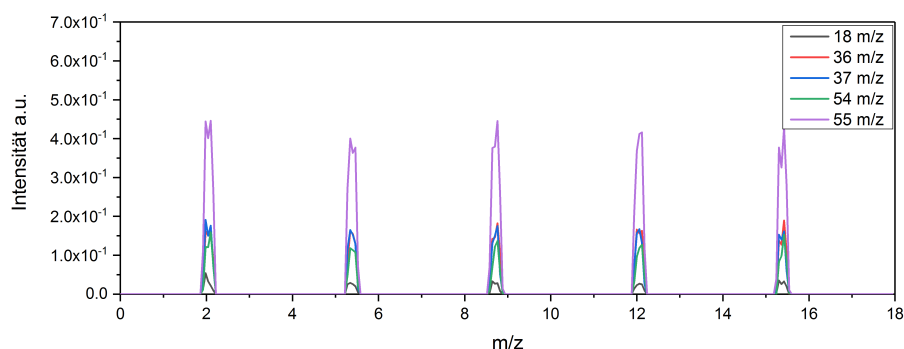


Abbildung 7.5: Zeitliche Detektion der gebildeten Ammonium- und protonierten Wasser-Cluster.

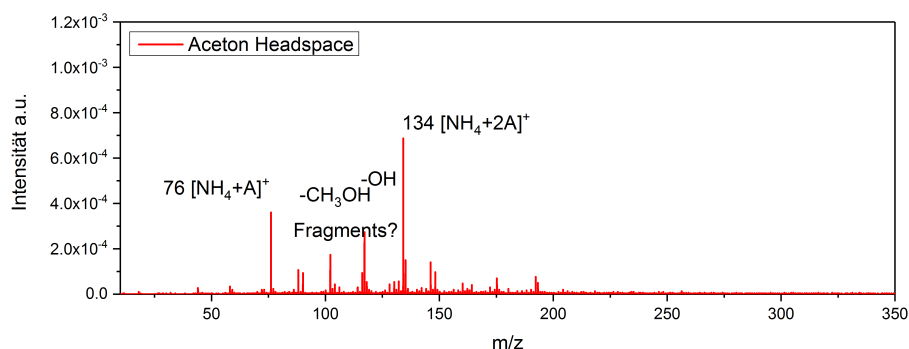


Abbildung 7.6: Massenspektrum des Aceton-Headspace mit Glow-Discharge-Ionenquelle.

ist zu überprüfen, ob es zu Fehlzündungen beim Einströmen des Gases kommt. Im Rahmen von Automatisierungsbestrebungen ist davon auszugehen, dass über fünf einzelne Öffnungsphasen ein gemittelttes Spektrum erhalten werden soll. In Abb. 7.5 ist der chronologisch abgetragene Verlauf einzelner m/z -Werte abgebildet. Grundsätzlich kann daraus entnommen werden, dass jede Öffnung des Ventils in dem verwendeten System zu einer Plasmazündung führt. Die Abweichung der Signale beträgt etwa 7 % um den mittleren Wert. Die gezeigten Verläufe repräsentieren die bereits beschriebenen Cluster und weisen stetig gleichbleibende Verhältnisse zueinander auf. Steile Flanken der Ionensignale zeigen, dass auch die Plasma-Löschung instantan geschieht und keine zeitliche Verzögerung eintritt, wozu es bei Sprayionisationen kommen kann. Dies ist für die schnelle Abfrage in kurzer Zeit wichtig.

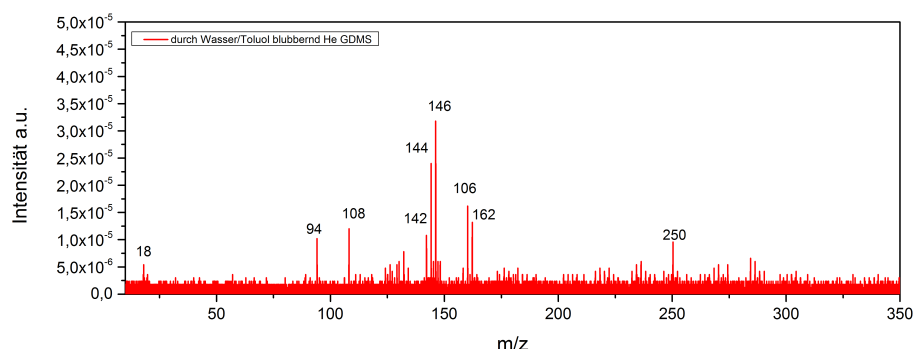


Abbildung 7.7: Massenspektrum eines Toluol/Wasser Gemisch Headspaces mit Glow-Discharge-Ionenquelle.

Als ein Beispiel für einen volatilen Analyten in der Gasphase ist das erhaltene Massenspektrum von reinem Aceton dargestellt (Vgl. Abb. 7.6). Es weist $[nM + mNH_4^+]$ -Cluster bis zu der Größe $n = 2$ auf. Von der Annahme ausgehend, dass sich im Plasma eine sehr hohe Anzahl reaktiver Spezies und eine hohe Energiedichte befindet, kann es bei dieser Ionisationstechnik zu Fragmentierungsreaktionen kommen. Diese könnten das Auftreten weiterer weniger intensiver Signale erklären. Darüber hinaus ist es möglich einen Stoff durch die eingebrachte Energie zu fragmentieren bzw. Cluster zu bilden, dass die Zuordnung wie in Abb. 7.7 zu sehen nicht mehr trivial ist.

Ob die bei diesem Experiment gewählte Wellenfunktion für die Bildung des Plasmas einen Einfluss auf die Massenspektren hat verdeutlicht die Graphik in Abb. 7.8 anschaulich. Die vier unterschiedlichen Wellenformen führen zu keinem nennenswerten Unterschied in der Qualität und auch nicht in der Quantität der Ionensignale. Für geringere Frequenzen wurde festgestellt, dass eine starke Flanke der Funktion zu einem gezielten Zünden des Plasmas führt, wohingegen eine Wellenfunktion zu eher zufälligen Zündungen führt. [151] Dass die gewählten Wellenformen keinen Einfluss auf die Spektren haben, kann mit der höheren Frequenz zusammenhängen. Durch den zehnfach schnelleren Wechsel der Polaritäten, ist der verhältnismäßige Einfluss einer steilen Flanke geringer, da die Steigung der Sinuskurve zugenommen hat. D.h. also, dass

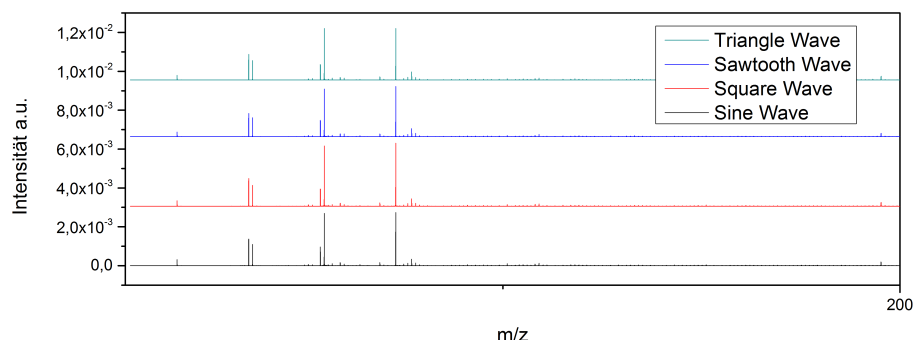


Abbildung 7.8: Einfluss der unterschiedlichen AC Wellenfunktionen auf die Qualität der Massenspektren.

sowohl eine steigende und auch fallende Polaritätsänderung eine Zündungen induziert.

Experimenteller Aufbau LA-DBDI

Für die LA-DBDI-Postionisation am levitierten Tropfen wird der Aufbau aus Abschnitt 4.4 verwendet. Dieser für Er:YAG-Laser-Desorption optimierter Aufbau wird vor den Massenspektrometereingang angebracht und um eine selbstgebaute DBD-Ionenquelle erweitert (siehe Abb. 7.9). Es ist darauf zu achten, dass sich der Eingang zum Massenspektrometer (Vgl. Abschnitt 3.7), der Punkt der Desorption und der Ausgang der Postionisationsquelle auf einer Ebene befinden. Damit der Tropfen nicht pneumatisch in das MS überführt wird, hat dieser einen kleinen horizontalen Versatz. Die Laserdesorption findet an der breitesten Stelle des leicht gestauchten Tropfens statt.

Die manuell in den Druckknoten des akustischen Levitators injizierten Tropfen haben ein Volumen von $5 \mu\text{L}$ ($d = 2 \text{ mm}$). Als Lösungsmittel wird Methanol ($50\%_{\text{vol}}$) verwendet. Mit Hilfe des gepulsten, auf den Tropfen fokussierten (MgF_2 Linse, $f = 100 \text{ mm}$, Thorlabs, USA) Er:YAG-Lasers (6 mJ pulse^{-1} , $\tau_p = 60 \mu\text{s}$, 100 Hz ; $\tau_p = 1 \mu\text{s} - 1 \text{ ms}$, DPM15, Pantec Engineering AG, Rugell, Liechtenstein), wird eine Laserdesorption durchgeführt. Der Laser emittiert eine Wellenlänge von $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$.

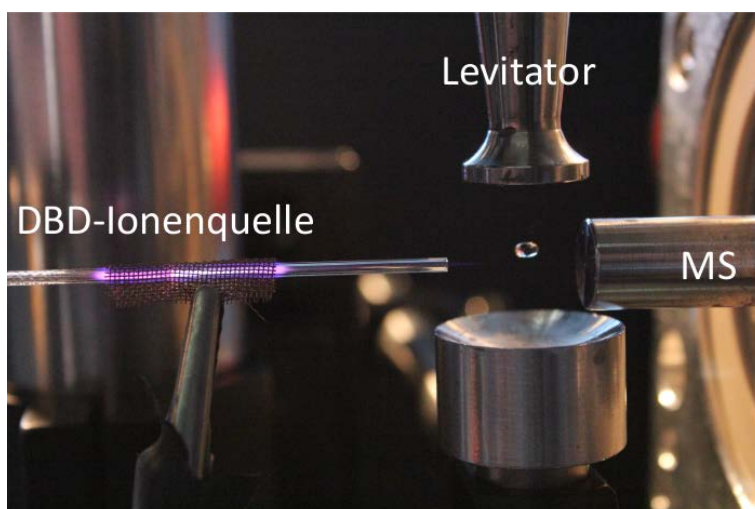


Abbildung 7.9: Kombination einer Plasma-Fackel und akustischer Levitation/Laser-Desorption.

Für alle DBDI-Postionisations-Experimente wird eine selbstgebaute Ionenquelle verwendet. Als Dielektrikum wird eine Borosilikat-Glaskapillare ($\varnothing_{\text{innen}} = 0,86 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{außen}} = 1,5 \text{ mm}$, Science Products GmbH, Hofheim, Germany) verwendet, deren Ende vor das Massenspektrometer montiert wird. Durch diese wird Helium (99,99 %, Linde AG) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 L min^{-1} (Flowcontroller, Bronkhorst High-Tech BV, Niederlande, F-201CV) geleitet. In diesen Gasstrom wird eine dünne Akupunkturnadel eingebracht (NSP 3070 Premium Silver Handle, L = 10 cm; Akupunkturnadeln-Wandrey GmbH, Berlin, Germany) und elektrisch geerdet. Um das Glas wird ein Kupferdrahtnetz eng gewickelt, welches als Hochspannungselektrode (7 kV, 120 Hz) dient.

Verwendete Chemikalien

Als Lösungsmittel wird eine 1:1 (v/v) Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Methanol (pure, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) Mischung verwendet. Fmoc-L-Isoleucin (> 98,0 % Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA) Ibuprofen (> 98,0 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Acetonitril (HPLC Grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) die Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

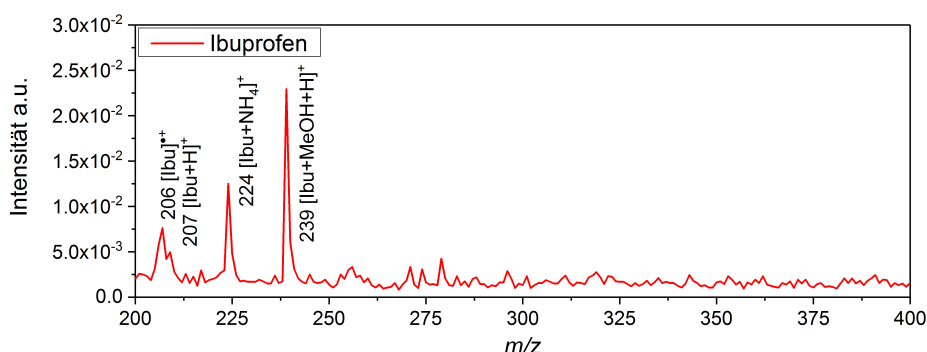


Abbildung 7.10: Spektrum von Ibuprofen ($M = 206,28 \text{ g mol}^{-1}$) einer $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ Lösung.

Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 7.10 ist das für Ibuprofen erhaltene Massenspektrum gezeigt. Das Spektrum wurde nach der Desorption von Material aus einem $5 \mu\text{L}$ Tropfen einer $100 \mu\text{M}$ Lösung erhalten. Es können sowohl einzelne Analytmoleküle, protonierte Analyten als auch Cluster mit Wasser und Methanol, welche durch deren Verwendung als Lösungsmittel im Überschuss zur Verfügung stehen, gemessen werden. Bisher war es nicht möglich saure Analyten ($pK_{aIBU} = 4,91$), auch wenn nur schwach sauer, in ausreichender Quantität mit der LDI aus dem Tropfen zu detektieren. Da diese in der Gasphase eher deprotoniert vorliegen, die Messungen jedoch im positiven Ionenmodus durchgeführt wurden, können die Ibuprofen-Anionen nicht nachgewiesen werden. Durch diese Postionisationstechnik stehen dem System nun ausreichend Ladungsträger zur Verfügung, wodurch auch die gewöhnlich deprotonierten Analyten einen Ladungsträger, z.B. NH_4^+ , aufnehmen oder im Cluster mit dem Lösungsmittel detektiert werden können.

7.3 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten zwei mögliche Ionisationsmethoden implementiert werden, welche dazu geeignet sind aus levitierten Tropfen desorbiertes Material direkt oder im Nachhinein zu ionisieren. Beide Techniken beruhen darauf, dass die bereits in die Gasphase überführten Moleküle in Rich-

tung des Massenspektrometers geleitet werden. Dabei ist die DBDI-Fackel quasi-kontinuierlich und kann eine permanente Abfrage der Umgebungsluft gewährleisten. [152] Der DBDI-Einlass ist gepulst, da er unter reduzierten Druckbedingungen eingesetzt wird und somit eine gepulste Abfrage der Umgebung ermöglicht. Die gezeigte DBDI-Fackel tastet permanent die Umgebung

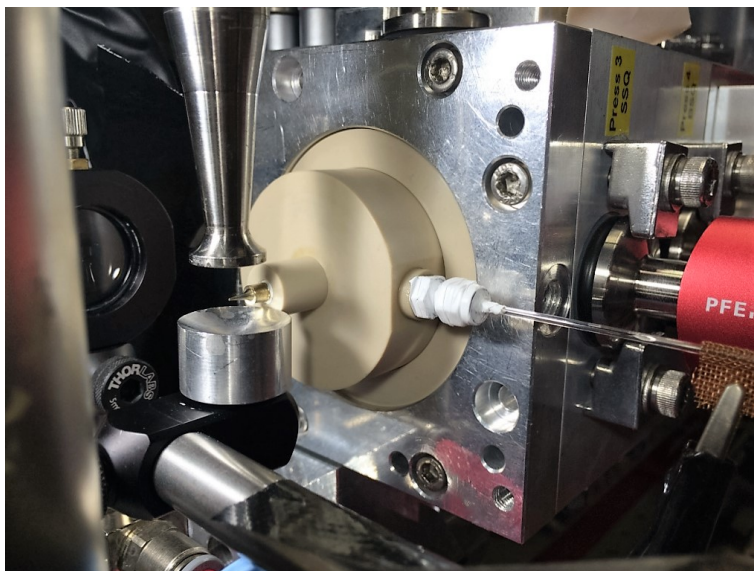


Abbildung 7.11: Orthogonal im Einlass implementierte DBDI-Plasmafackel.

des Tropfens ab. Dies führt längerfristig zu einer Erwärmung des Tropfens und somit zu dessen Evaporierung. Diese Technik ist daher für die kontinuierliche Abfrage nur bedingt einsetzbar. Es ist für einen kurzen Zeitraum z.B. während einer Laserdesorption möglich diese Technik einzusetzen, doch sollte vor jeder Messung ein neuer Tropfen in den Levitator eingebracht werden, um die Einflüsse der Veränderungen im Tropfen selbst auf die Messung so gering wie möglich zu halten. Jedoch ist diese Technik sehr robust und universell einsetzbar. So konnten auch Analyten detektiert werden, welche zuvor aufgrund einer zu geringen Protonenaffinität nicht detektierbar waren.

Der Einlass hat den Vorteil, dass er für Laserdesorption am Tropfen synchronisierbar ist und so eine exakte Bestimmung eines relevanten Zeitraums für die Signalabfrage ermöglicht. Gleichzeitig bietet es die Option, dass nach jeder Messung die Ionisationskammer möglichst

rückstandslos regeneriert und so der Memory-Effekt umgangen wird. Da Luft alternativ zu Helium als Gasstrom genutzt werden kann, ist diese Technik instrumentell wenig aufwendig und die laufenden Kosten sind geringer als bei einer Fackel, welche kontinuierlich mit z.B. Helium versorgt werden muss.

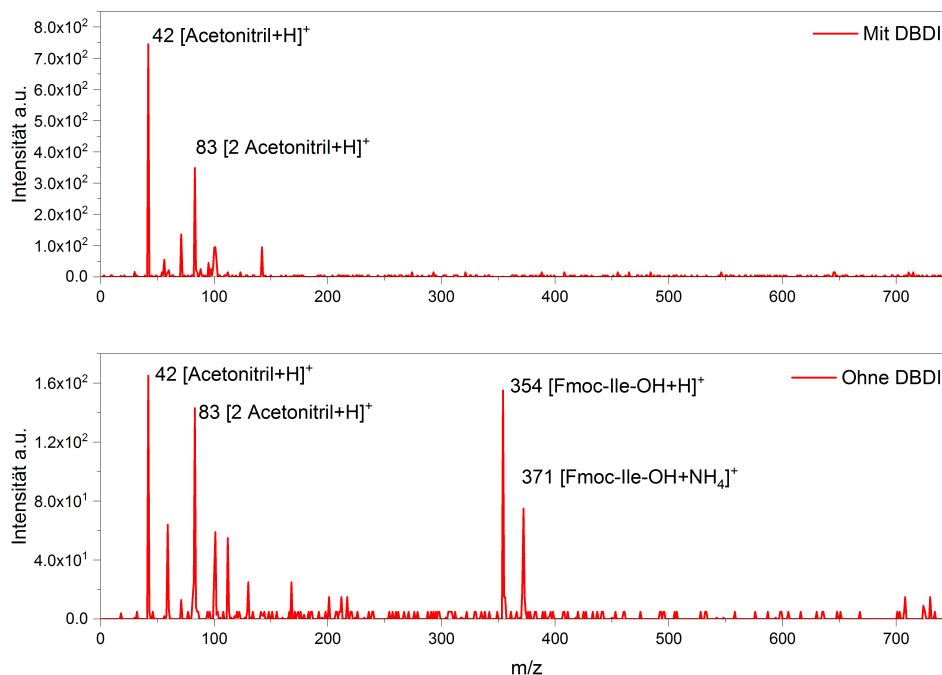


Abbildung 7.12: Vergleich eines mittels LDI erhaltenen Massenspektrums von Fmoc-Ile-OH ($M = 353,41$) mit DBDI-Quelle (oben) und ohne (unten).

Um eine räumliche Trennung der Desorption und der Postionisation zu gewährleisten, ist ein weiterer Einlass entwickelt worden (Vgl. Abb. 7.11). Dieser kombiniert die Vorteile einer effektiven Ionisation und eines konischen Einlasses, um eine möglichst gute Analytmolekül-Transmission in das MS zu erreichen. Ähnlich wie bei der Durchflusszelle ist hier die Desorption/Ionisation von der Postionisation getrennt. Durch diese räumliche Separation kann der levitierte Tropfen stabiler im Ruhezustand gehalten werden, da kein zusätzlicher Gasstrom am Tropfen selbst vorbei geleitet wird wie bei der bisherigen DBDI-Quelle. Darüber hinaus kann

so zukünftig besser auf individuelle Optimierungsparameter eingegangen werden. In Abb. 7.12 sind Spektren von Fmoc-geschütztem Isoleucin dargestellt, welche mit Hilfe von LDI erhalten wurden. Es zeigt, dass Signale stabiler Moleküle wie Acetonitril um etwa den Faktor 5 verstärkt werden können. Jedoch zeigt es auch, dass instabile Moleküle zu Fragmentierung durch die, mit der DBD-Quelle eingebrachte, Energie neigen.

Nachdem ein System entwickelt ist, bei dem die eingebrachte Energie besser kontrolliert werden kann, wird die Nutzung dieser Techniken dazu beitragen bei Analyten von geringer Konzentration ein Messsignal in Totalanalysesystemen zu erzeugen, welches sehr reproduzierbar ist. Somit empfiehlt es sich im Rahmen von Spurenanalytik oder HTS-Untersuchungen in TAS eine Postionisation zu nutzen.

Kapitel 8

Optische Spektroskopie in der Whispering Gallery Mode von levitierten Tropfen

8.1 Einleitung

Optische Resonatoren, auch engl. *Cavity* genannt, spielen bei der Entwicklung des Lasers eine wichtige Rolle für die Qualitätseigenschaften der Produkte und tragen maßgeblich zu den Vorteilen von Laserstrahlung gegenüber nichtkohärenter Lichtquellen bei. In diesen Resonatoren wird Licht mehrfach von einer zur anderen Seite des Resonators reflektiert und durchquert dabei das aktive Medium. Während der vielen Umläufe interferiert das eingefangene Licht mit sich selbst und es kommt zu einer sogenannten Modenstruktur. Dies bedeutet, dass Licht mit einer Wellenlänge, welche die Resonanzbedingungen der Cavity erfüllt, verstärkt wird, während nicht-resonante Anteile über destruktive Interferenz unterdrückt werden. Für optische Resonanz muss ähnlich wie bei akustischen Wellen bei Lasern die Bedingung erfüllt sein, dass sich die Spiegel, welche den Resonator begrenzen, im Abstand $L = \frac{n\lambda}{2}$ zu einander befinden. Ein Spiegel muss für die kohärente teilweise Strahlung durchlässig sein, um Licht zu emittieren. Dies kann z.B. durch einen Q-Switch ermöglicht werden. Für eine optimale Kohärenz muss der sogenannte Qualitäts-Faktor (Q-Faktor) des Resonators sehr hoch sein (Laser $\approx 10^9$). In den vergangenen Jahren haben stehende Lichtwellen in optischen Ringresonatoren, den sogenannten *Whispering Gallery Modes*, an Aufmerksamkeit gewonnen. [153, 154, 155] Diese Ringresonatoren bewirken, dass Licht in ihrem Inneren durch totale interne Reflektionen an dem Phasenübergang zum umgebenden Medium gespeichert und auf sphärischen Bahnen entlang der inneren Peripherie geleitet wird. Der für diese spezielle Art von Resonatoren benötigte Q-Faktor ist typischerweise sehr hoch ($\approx 10^{11}$) und im Wesentlichen durch Oberflächenrauigkeit limitiert, welche aus der Fertigung der Resonatoren rührt.

Diese Whispering Gallery Modes (WGM) in optischen Ringresonatoren finden bereits Anwendung bei der Produktion von Lasern mit niedriger Laserschwelle und einer schmalen Emission. Dazu können z.B. Mikrometer große Glaskugeln genutzt werden, [156] oder Flüssigkeiten auf superhydrophoben Trägermaterialien. [157] Die niedrige Pumpschwelle beruht nicht zu

Letzt auf dem sehr hohen, bereits erwähnten, Q-Faktor sondern auch auf der geringen Größe (z.B.: des Volumens, V), denn das Q/V -Verhältnis beeinflusst die effiziente Kopplung des Lichtes in das Medium. Im Gegensatz zu klassischen Lasern übernimmt bei dieser Art von Resonatoren das aktive Medium bzw. dessen Grenzschicht zur Umgebung oftmals gleichzeitig die Spiegelfunktion. Die Resonatorbedingungen können adaptiert für Ringresonatoren wie folgt dargestellt werden: $2\pi nR = m\lambda$, wobei n der Brechungsindex des Resonators ist, R dessen Radius und m die Anzahl an verschiedenen resonanten Wellenlängen angibt. Theoretisch kann Licht unendlich lange in einem perfekten Resonator gespeichert werden, jedoch ist dies praktisch nicht umsetzbar. Neben rauen Oberflächen oder anderen beabsichtigten Defekten in der Oberfläche, würde die WGM trotzdem abklingen. Diese Eigenschaft ist damit zu begründen, dass Licht, quantenmechanisch betrachtet, außerhalb eines Resonators eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit ($\psi \cdot \psi^*$) besitzt. Das bedeutet, auch wenn der Resonator perfekt wäre, dass ein Teil des Lichts permanent emittiert wird. Dieses Phänomen wird als Evaneszenz bezeichnet.

Dieses Auftreten von evaneszenten Wellen kann umgekehrt dazu genutzt werden, um Licht in den Resonator hinein zu leiten. Problematisch ist es Licht möglichst effizient in ein System hinein zu übertragen. Zu diesem Zweck können z.B. Prismen oder Lichtleiter genutzt werden. [158] Am effektivsten für stationäre Ringresonatoren haben sich ihrerseits evaneszierende, in der Länge gezogene, Lichtleiter erwiesen. Diese werden erhitzt und auf eine Dicke von etwa 1–4 μm gezogen. [159] Dies hat zur Folge, dass im Verhältnis zum Kern des Leiters eine sehr große Oberfläche entsteht und sofern die Faser sehr nah an den Ringresonator gebracht wird, können Lichtwellen auf den Resonator übertragen werden. Die gesteigerten evaneszenten Eigenschaften der Faser tragen dazu bei eine etwa 99%ige Kopplungseffizienz zu erhalten. Neben dieser Technik kann eine direkte Einkopplung des Lichtes erfolgen. Kleine Radien eines Pumplasers haben den Nachteil, dass die Einkopplung nur bei präziser Strahlpositionierung möglich ist und diese Technik daher oft nur in Aerosolen, d.h. großen Ensembles vieler einzelner Tropfen, ein-

gesetzt wird, bei denen die Wahrscheinlichkeit hoch ist eine optimale Einkopplung in einige wenige, stochastisch günstig gelegene, Tropfen zu erhalten. Gaber *et al.* verwenden hingegen einen Millimeter großen Strahl und nutzen die Gaussverteilung des Lichtes im Strahlprofil aus. [160] Der zudem den Vorteil hat, dass ein Kontakt mit dem Ringresonator praktisch ausgeschlossen werden kann und so beispielsweise flüssige Resonatoren nicht durch Kapillarkräfte zerstört werden. Bei dieser Methode wird der Laserstrahl neben einem optischen Resonator fokussiert. Dabei können die Flanken des Strahles mit dem Resonator wechselwirken bzw. eintreten und dessen WGMs initiieren.

Eine freie Lasereinkopplung kann demnach an einem Tropfen oder anderen sphärischen Objekten durchgeführt werden. Sofern man Trägermaterialien entfernen möchte, um äußere Einflüsse möglichst zu minimieren, gibt es zwei Herangehensweisen: das Medium muss fallend am Laser vorbeigeleitet/-tropft [161] oder es muss eine Levitationsmethode [162] eingesetzt werden. Tropfen, welche Laserfarbstoffe enthalten, können durch einen Laserstrahl getropft werden. Sofern die Pumpschwelle für das Lasing überschritten ist, fungieren diese Tropfen als Lasermedium und können kohärentes Licht einer bestimmten sehr schmalen Wellenlänge emittieren. Beobachtet man deren Lichtemission fällt auf, dass mehrere sehr schmale Banden emittiert werden und keine breite Fluoreszenz detektierbar ist. Die unterschiedlichen Lasing-Wellenlängen werden von Qian *et al.* auf unterschiedliche Resonanzbedingungen der in den Tropfen reflektierten und verstärkten Emission des fluoreszierenden Laserfarbstoffes zurück geführt, wie z.B. dessen Größen und Formen. Somit haben auch geringe Schwankungen der Geometrie aufeinanderfolgender Tropfen bereits einen schwerwiegenden Einfluss auf das spektrale Abstrahlverhalten. Um diesen Problemen entgegenzuwirken ist eine Levitationstechnik sehr hilfreich, da Tropfen stabil in Form und Position gehalten werden können. Für größere Tropfen eignet sich die akustische Levitation. Erstmals wurde diese Kopplung von der Gruppe um Nielsson und Kristensen im Jahr 2006 publiziert. [163] Sie nutzten dazu Rhodamin 6G

Tropfen (750 nL, 20 mM) als Laserfarbstoff und beobachteten eine für Laser recht breite nicht-resonante Fluoreszenz von 620 - 640 nm. Da Lasingprozesse innerhalb des Lasermediums somit durchführbar sind, kann diese Methode auch für Intra-Cavity-Spektroskopie Analysen nutzbar gemacht werden.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse einer Studie von akustisch levitierten Tropfen, welche als Lasermedium (optischer Ringresonator) dienen, gezeigt. Da die Oberfläche sich selbst arrangiert (sie unterliegt in Flüssigkeiten einem dynamischen Gleichgewicht intermolekularer Wechselwirkungen), ist sie nahezu perfekt geglättet und resultiert in sehr guten Reflektions-eigenschaften an der inneren Peripherie des Tropfens. Der Lichtverlust über diesen Weg ist minimiert und die Finesse des Resonators sollte deutlich höher sein als bei herkömmlichen Resonatoren. Durch die so erhaltene lange Verweildauer des Lichtes im Tropfen legt der Lichtstrahl eine deutlich längere Strecke zurück obwohl dieser nur einige mm im Durchmesser groß ist. Gemäß Lambert-Beerschem Gesetz $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$, wobei E die Extinktion, ε der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke ist, kann so diese Weglänge d enorm verlängert werden. Diese Technik kann so dazu beitragen eine sehr sensitive Spurenanalyse im Tropfen selbst durchzuführen.

8.1.1 Nutzen für Totalanalysesysteme

Diese kontaktlose spektroskopische Technik kann zur Analyse von Probemengen im akustisch levitierten Tropfen genutzt werden, um neben den bisher erwähnten massenspektroskopischen zusätzliche spektroskopische Informationen aus einem Tropfen mit Hilfe eines System zu erhalten. Die generellen Vorteile der kontaktlosen Analyse ist in den vorangegangenen Kapiteln ausreichend besprochen worden. Der Beitrag zu einem TAS liegt in diesem Fall darin, dass mit dieser Technik zusätzlich zu den Daten aus der Massenspektrometrie auch strukturelle Informationen über die zu analysierenden Moleküle erhalten werden können, was nur mit MS nicht

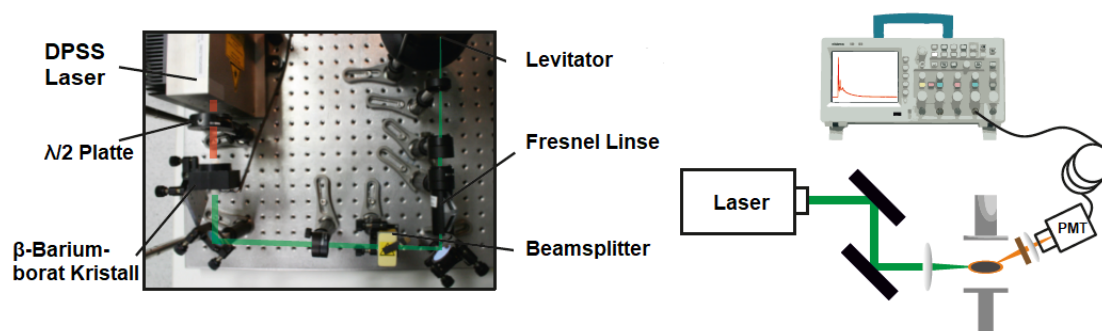


Abbildung 8.1: Aufbau des Lichtweges vom Laser bis zum Levitator.

möglich wäre. Darüber hinaus könnten durch die konkrete Abfrage der an der Oberfläche stattfindenden Reaktionen oder Verdampfungseffekte beobachtet werden. Dies fand z.B. für Reaktionen mit Ozon, wie bei FIDI [125] bereits erwähnt, Anwendung. Doch der wichtigste Vorteil für ein μ TAS ist, dass die Weglänge innerhalb des Tropfens sehr stark verlängert wird und die Empfindlichkeit für eine einzelne Messung so hoch werden könnte, dass gerade bei kleinen Substanzmengen nur wenig Analytlösung zur Analyse aufgebracht werden muss. Ein weiterer Vorteil dieser Kopplung ist, dass bei einem gezielt eingesetzten Laser für die Desorption (sofern diese Technik verwendet werden soll) und Spektroskopie ein einzelner Laser ausreichen könnte und so instrumenteller Aufwand, Platz (der für andere Zuführungen genutzt werden kann) und Kosten gespart werden.

8.2 Experimenteller Aufbau

Der grundlegende Aufbau besteht aus einem Levitator (Tec5, 56MHz, Oberursel, Deutschland), einem Laser (Compact Laser Solutions, Blade, $\lambda = 1064 \text{ nm}$, 1000 Hz, Berlin, Deutschland) und diversen optischen Elementen wie in Abb. 8.1 gezeigt ist. Der Laserstrahl wird zunächst in einem beta-Bariumborat (BBO) Kristall frequenz-verdoppelt, um die gewünschte Anregungswellenlänge von 532 nm zu erhalten. Über einen Spiegel und eine Linse wird dieser Strahl durch einen dichroiden Strahlenteiler geleitet. Dies hat zur Folge, dass etwaig-übriges Licht der

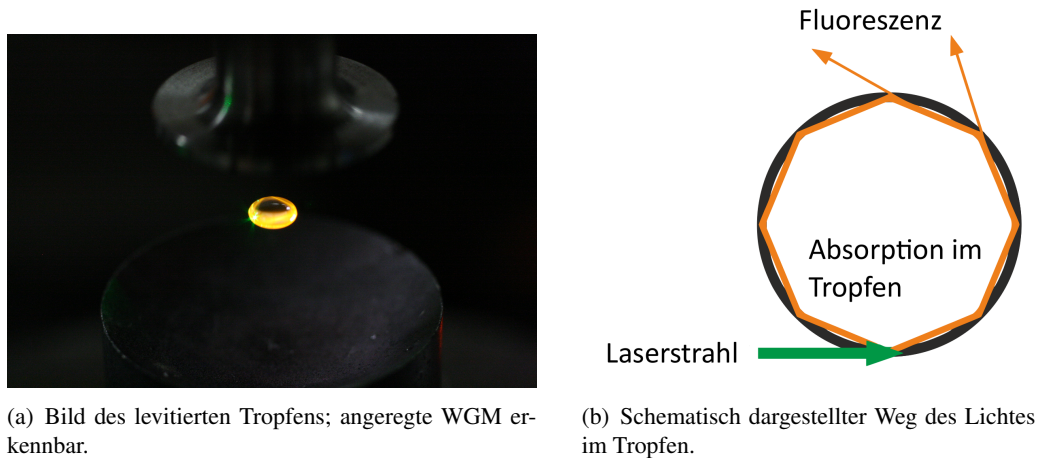


Abbildung 8.2: Darstellung des grundlegenden Prinzips der Whispering Gallery Mode (WGM).

Wellenlänge 1064 nm vom Hauptstrahl getrennt wird und so bei der Tropfenbestrahlung keine Interferenzen entstehen. Der Lichtstrahl wird zudem durch ein Fresnelsches Doppelrhomboeder geleitet. Austretendes Licht wird in diesem optischen Element nach zirkular polarisierten Komponenten getrennt, gemäß seiner Polarisierung verzögert und anschließend wieder kombiniert. In Summe ergibt sich aus diesen Einzelprozessen eine Rotation der linearen Polarisationssebene im Laborkoordinatensystem. Um eine bestimmte Ausrichtung der Lichtwellen zu erzielen, wird der Rhomboeder auf einer rotierenden Halterung (FR600HM, Thorlabs, USA) befestigt. Im Anschluss wird der Strahl weiter fokussiert und kann so präzise auf den Tropfen gerichtet werden.

Tropfen mit dem Volumen von $7 \mu\text{L}$ ($d = 2 \text{ mm}$) werden in den Levitator eingebracht. Dieser befindet sich auf höhenverstellbaren Untersätzen, damit eine Grobjustage auf den Fokus des Laserstrahls durchgeführt werden kann. Die Probelösung, welche in den Druckknoten eingebracht wird, ist eine $1 \mu\text{M}$ Rhodamin B Lösung. Als Lösungsmittel werden Ethylenglycol und MeOH verwendet. Ethylenglycol hat den Vorteil, dass der Dampfdruck sehr niedrig und so der Tropfen länger haltbar ist. Der Laserstrahl wird auf den Tropfen feinjustiert, regt die Fluoreszenz des Rhodamin B an und kann, wie in Abb. 8.2 gezeigt, beobachtet werden.

Es werden zwei Arten von Experimenten durchgeführt: a) spektral aufgelöst und b) zeitaufgelöst. Für die spektral aufgelösten Experimente wird eine Sammellinse auf der Höhe des Tropfens installiert und über eine Lichtleiterfaser die Fluoreszenzmission in ein Echelle-Spektrometer (LTB, Butterfly, Aryelle, Berlin, Deutschland) geleitet. Für zeitaufgelöste Spektren wird das gesammelte Licht auf einen Photoelektronenvervielfacher (R928, Hamamatsu Photonics K.K., Japan) fokussiert und so der korrelierende Strom mittels Oszilloskop (Tectronix, TDS 2024B, Beaverton, USA) aufgezeichnet.

Verwendete Chemikalien

Als Lösungsmittel werden Ethylenglykol (99,0 %, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und Methanol (> 99,9 % pure, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Laserfarbstoff dient Rodamin B (Lambdachrome, Lambda Physik, Germany). Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

8.3 Ergebnisse und Diskussion

Eine der wichtigsten Herausforderungen dieser Methode ist es eine Technik zu entwickeln, die es erlaubt Licht effizient in den Tropfen zu überführen. Aufgrund des höheren Brechungsindex der Lösungsmittel gegenüber der umgebenden Luft wird sehr viel Licht reflektiert und gelangt nicht in den Tropfen, d.h. dem eigentlichen Ringresonator. Die verschiedenen Transmissionsüberlegungen wurden bereits im ersten Abschnitt dieses Kapitels angegeben. Dort wurde beschrieben, dass die kontaktlose Laser-Strahl-Einkopplung vorteilhaft ist. Es wurden ebenfalls evaneszierende Wellen aus ausgezogenen Lichtwellenleitern (LWL) versucht. Dieser Ansatz führten jedoch stets dazu, dass die Venturikräfte durch die Schallwellen, die durch den Luftspalt zwischen LWL und Tropfen dringen, zu einer Anziehung des Tropfens in Richtung LWL und einem resultierenden Benetzen führten. Der Weg der kontaktlosen Kopplung wurde daher als einzig praktikabler Ansatz weiterverfolgt. Um diese möglichst effiziente Kopplung zu

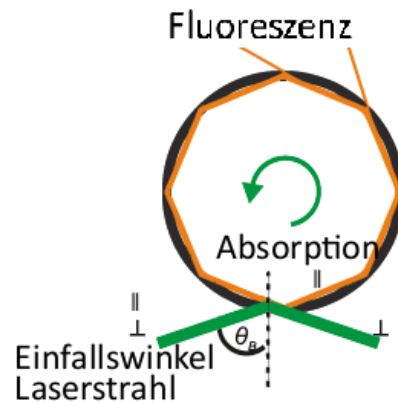


Abbildung 8.3: Schematische Darstellung des Brewster-Winkel θ am Ringresonator.

erhalten, wird das Licht polarisiert und es wurde versucht die spezifischen Eigenschaften des polarisierten Licht bei Reflexionen auszunutzen. Sir David Brewster hat ein dabei auftretendes Phänomen beschrieben. [164] Der sogenannte Brewster-Winkel gibt an, dass beim Auftreffen von Licht auf eine Grenzfläche nur die senkrecht zur Ebene polarisierten Anteile reflektiert werden, hingegen können parallel verlaufende Wellen diese Grenze passieren. In Abb. 8.3 ist die Adaption für den Ringresonator schematisch dargestellt.

In Abb. 8.4 sind drei Photographien zu sehen, welche den Lichtweg im Tropfen zeigen. Das Licht trifft auf die Grenzfläche des Tropfens, wird teilweise in den Tropfen überführt und gebrochen. Anteilig wird grünes Licht reflektiert, welches zur Anregung der WGMs nicht mehr zur Verfügung steht. Um das Licht möglichst quantitativ in den Tropfen zu überführen, kann das Licht entsprechend der angegebenen Winkel polarisiert werden. Die so unterschiedlich ausgerichteten Lichtwellen sollten bei einem bestimmten Winkel minimal reflektiert werden. Erkennbar ist der Trend, dass bei einer Rotation des Fresnelsches Doppelrhombos die Lichtintensität des reflektierten Lichtes zunimmt.

Im Tropfen wird das Licht von den Rhodamin B Molekülen absorbiert und es wird orange-farbenes Licht in Form von ungerichteter Fluoreszenz abgegeben. So können die Primärpfade der Laserstrahlen im Tropfen bei entsprechender Kameraeinstellung (F/6.3, 1/6 s, ISO-1600,

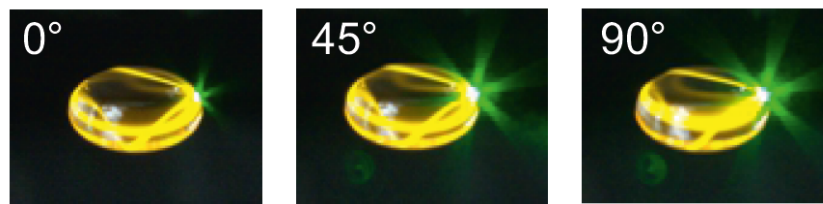
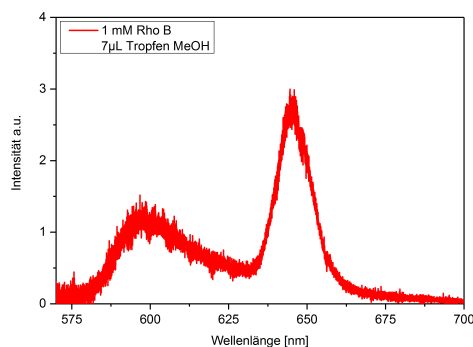
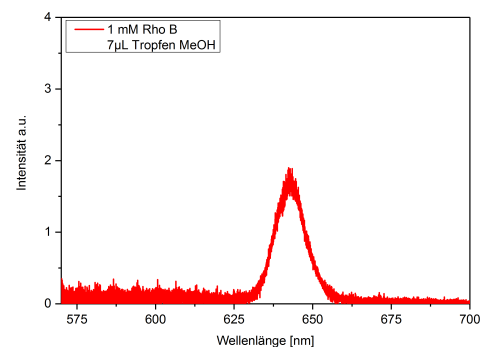


Abbildung 8.4: Sichtbares Licht am Tropfen bei unterschiedlichen Polarisationswinkeln.



(a) Spektrum der Fluoreszenzbande und Lasing, Sammeloptik befindet sich am oberen Tropfenrand.



(b) Ausschließliche Beobachtung des Lasing, Sammeloptik befindet sich am mittigen Tropfenrand.

Abbildung 8.5: Spektral aufgelöste Beobachtungen der Emissionsprozesse am Tropfen im Levitator.

F = 50 mm) verfolgt werden. Neben diesen Hauptwegen ist zu erkennen, dass sich am Rande des Tropfens, genauer auf der Hauptachse des Ellipsoids, ringförmige Linien ausbilden. Dies sind die Whispering Gallery Modes. WGM funktionieren ähnlich einer Laser-Cavity und können Lasingprozesse induzieren. Dabei fungiert der Laserfarbstoff Rhodamin B als Medium. Entlang der inneren Grenzfläche können kohärente Photonen eine stimulierte Emission erzeugen. Diese Prozesse finden durch Totalreflexionen innerhalb des Tropfens statt. Aufgrund der Symmetrie des Tropfens können unterschiedliche WGMs angeregt werden. Diese führen zu einer Anregung und Verstärkung verschiedener Wellenlängen, welche die Resonanzbedingungen erfüllen.

Das Lasing lässt sich in Abb. 8.5 spektral aufgelöst beobachten. Im linken Bild ist die Sammeloptik ein wenig oberhalb des Tropfenmittelpunkts angebracht. Es sind deutlich zwei Be-

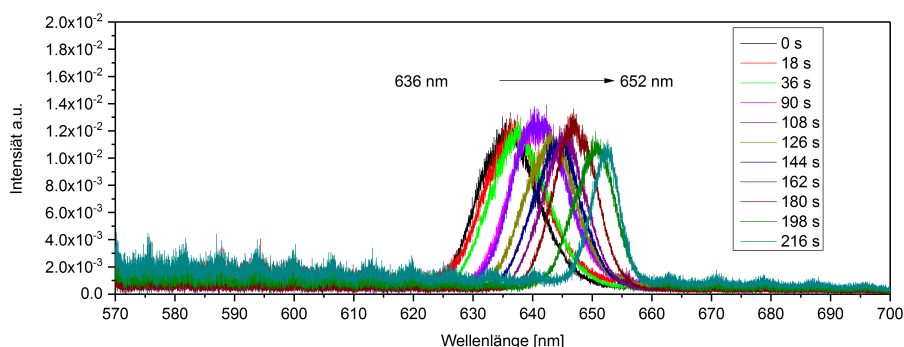


Abbildung 8.6: Beobachtete Verschiebung des Emissionsmaximums im Verlaufe der Zeit durch Verdampfung des Methanols.

reiche erkennbar. Zum Einen die für Rhodamin B charakteristische breite Fluoreszenzbande ($\lambda_{max} \approx 600$ nm) und zum Anderen ein zweites Signal, welches verhältnismäßig schmal ist (FWHM: 14 nm). Dieses schmalere Signal zeigt eine Verstärkung eines bestimmten spektralen Bereiches um $\lambda = 636$ nm. Wird die Sammeloptik horizontal auf die gleiche Höhe des Tropfens angebracht kann lediglich die verstärkte Bande detektiert werden. Das lässt darauf schließen, dass auf dieser Ebene lediglich annähernd gleiche Wellenlängen emittiert werden und Lasingprozesse stattfinden.

Bei den Experimenten mit Methanol ist ein besonderes Phänomen beobachtet worden. In Abb. 8.6 ist das schmale Signal der Lasingprozesse gezeigt. Bei einer Konzentration von 1 M Rhodamin B in reinem Methanol und einer Tropfengröße von $7 \mu\text{L}$ kann ein Signal, dessen Emissionsmaximum bei 636 nm liegt, beobachtet werden. Nach 216 s ist der Tropfen deutlich geschrumpft, was mit einer Konzentrationserhöhung einhergeht. Jedoch sollte dies theoretisch keine Veränderung der Wellenlänge bewirken. Somit muss ein weiterer Vorgang stattgefunden haben. Die Gruppe um Tomioka [165] hat den Einfluss von Aggregatbildung auf die Fluoreszenz von Rhodamin 6G beschrieben. Wie bei J-Aggregaten, scheinen sich die Moleküle zu organisieren und so das Maximum der Fluoreszenz zu längeren Wellenlängen (bathochrome

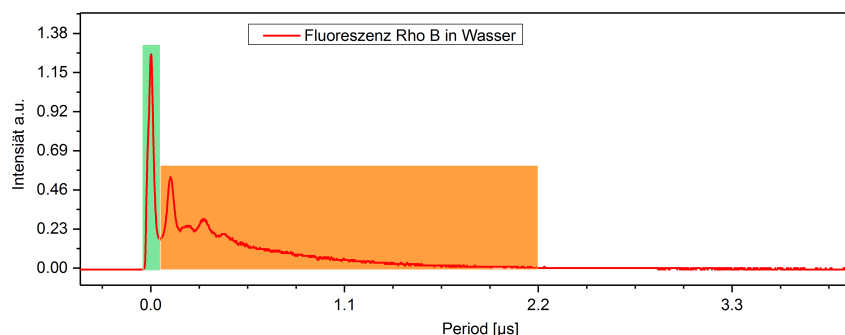


Abbildung 8.7: Zeitlich aufgelöster Verlauf einer Anregung der Fluoreszenz im Tropfen.

Verschiebung) verschoben zu haben. Es ist somit möglich eine Molekülselbstorganisation online mittels Fluoreszenzspektroskopie im Tropfen zu beobachten.

Abb. 8.7 zeigt eine aufgezeichnete Abklingkurve des Fluoreszenzsignals. Dabei wird die Zeit in μs auf der horizontalen Achse und eine relative Intensität auf der vertikalen Achse aufgetragen. Das Signal wird mit Hilfe eines Photomultipliertubes (PMT) erzeugt und ist wellenlängenunspezifisch. Jedoch ist ein Filter eingebracht, der das grüne Laserlicht möglichst herausfiltert, so dass es von der PMT nicht detektiert wird. Das bedeutet, dieses Experiment ist in völliger Dunkelheit durchgeführt worden, um unerwünschte Interferenzen auszuschließen. Trotzdem kann es dazu kommen, dass reflektierte Photonen des Lasers selbst auch detektiert werden. Grob kann so der Geradenverlauf in zwei Abschnitte aufgeteilt werden: Der schmale Laserimpuls (grün) initiiert die Fluoreszenz (orange), welche im Anschluss detektierbar ist. Durch die Variation der Tropfengröße und die Wahl von unterschiedlichen Einfallswinkel des Laserlichts am Tropfen sollte die Dauer sowie Intensität der detektierten Fluoreszenz beeinflusst werden können. Durch eine so erreichte länger andauernde Anregung der Fluoreszenz durch im Tropfen zirkulierendes Laserlicht, ist die Abklingzeit der Fluoreszenz länger. Anhand der Abklingzeit ist es möglich die im Tropfen zurückgelegte Weglänge zu berechnen. Diese wiederum sollte gemäß Lambert-Beerschen Gesetz mit der vorhandenen Analytkonzentration korrelierbar sein. So soll die Empfindlichkeit einer Absorptionsmessung im Tropfen drastisch

gesteigert werden. Da der Strahl auf eine kreisförmige Bahn am Rand des Tropfens geleitet wird, kann näherungsweise die Weglänge χ im Tropfen bestimmt werden:

$$\chi = \frac{kc}{n} \quad (8.1)$$

Dabei beschreibt $k = 1 \cdot 10^{-6}$ s die Abklingzeit, $c = 3 \cdot 10^8$ m/s die Lichtgeschwindigkeit und $n \approx 1,33$ den Brechungsindex von Methanol. Bei einer Abklingzeit von etwa $1 \mu\text{s}$ entspricht das etwa einer Weglänge von 250 m. Dies wiederum entspricht etwa 100.000 Rundläufen im Tropfen selbst.

8.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten Lasingprozesse im Tropfen angeregt und die Weglänge bestimmt werden. Anhand dieser ersten grundlegenden Überlegungen und Forschungsergebnissen zeigt sich die enorme Bedeutung dieser Methode. Die ergänzenden spektrometrischen und spektroskopischen Informationen aus einem einzelnen Tropfen zu extrahieren, ermöglicht es bei einer kontaktlosen Probenpräparation, Handhabung und Analyse ein Maximum an qualitativen und quantitativen Daten über die Inhaltsstoffe zu erhalten. Da der spektroskopische Ansatz ohne Substanzverlust durchgeführt werden kann, muss dieser Schritt immer vor dem MS-Experiment am Tropfen durchgeführt werden. Es muss bei entsprechender Photonendichte jedoch darauf geachtet werden, dass je nach Wellenlänge das verdampfende Lösungsmittel durch die in das System eingebrachte Energie eine Rolle spielen könnte. Dies führt dazu, dass sich Agglomerate bilden und so die Analyse zu fehlerhaften Ergebnissen nicht nur in der Signalintensität, sondern auch in der Signalqualität zu Verschiebungen der Wellenlänge führen kann. Die phänomenologische Beobachtung in den Bildern 8.4 zeigt, dass Lasingprozesse stattfinden und auch für analytische Zwecke genutzt werden könnten. So birgt diese Technik ein großes Potential für TAS-Durchläufe in den unterschiedlichsten Studien.

Für zukünftige Experimente ist es wichtig dieses Experiment in einem geschlossenen und möglichst dunklen Gehäuse durchzuführen. Dieser Aufbau bietet zwei Vorteile: zum Einen können so spektroskopische Analysen durchgeführt werden, welche nicht durch Interferenzen (Laborbeleuchtung) beeinflusst werden. Zum Anderen hilft solch eine Kammer extern-verursachte Luftströmungen innerhalb des Levitators zu minimieren. Dies führt zu einer stabileren Levitation und ermöglicht eine direkte und exakte Fokussierung des Lasers auf den Tropfen. Sofern unterschiedliche Wellenlängen für Spektroskopie und Spektrometrie (falls LDI genutzt wird) benötigt werden, wäre es eine hilfreiche Möglichkeit partiell den selben Lichtweg zu nutzen, um spektroskopische Analysen und Desorptionen über die selben optischen Elemente in eine solche Levitationskammer zu leiten. Da der Resonatorverlauf sowie die Oberflächenkonzentration offensichtlich die spektrale Antwortfunktion beeinflusst, war es an dieser Stelle leider nicht möglich, eine spektrale Analyse der chemischen Zusammensetzung im Tropfen anhand einer praktischen analytischen Fragestellung zu bestimmen. Die Methode der optischen Spektroskopie innerhalb der WGM von akustisch levitierten Tropfen ist jedoch ein faszinierendes Forschungsgebiet, welches in zukünftigen grundlegenden Studien besser erforscht werden soll. Die Methode birgt neben der Sensitivitätssteigerung durch den drastisch verlängerten Wechselwirkungsquerschnitt zwischen Licht und Analyt scheinbar auch eine oberflächensensitive Abfrage von Probenlösungen.

Kapitel 9

Schlussbetrachtungen

9.1 Instrumentelle Neuerungen

Im Rahmen der Forschungsarbeiten dieser Arbeit konnten vier grundlegende Neuerungen entwickelt oder weiterentwickelt werden: a) Laserdesorption Massenspektrometrie bei $2,94\ \mu\text{m}$, b) Sonic Spray Ionisation Massenspektrometrie, c) Field-induced droplet ionisation assisted by ultra sound Massenspektrometrie und d) Optische Spektroskopie in der Whispering Gallery Modes im levitierten Tropfen. Neben diesen vier Hauptthemen waren unterschiedlichste Anpassungen nötig, um eine Durchführbarkeit der einzelnen Methoden zu ermöglichen und technische Voraussetzungen zu schaffen, die einen Einsatz in den zukünftigen tropfenbasierten μTAS gewährleisten. Alle vier, in ihrer Art unterschiedlichen, Methoden eint die Möglichkeit, sie im Rahmen der HTS im Bereich der kontaktlosen Probenhandhabung zu nutzen und zusätzliche Informationen hinsichtlich Lösungszusammensetzung qualitativ als auch quantitativ zukünftig zu erhalten. Oftmals sind die individuellen analytischen Ansätze komplementär, d.h. sie liefern orthogonale Informationen und lassen sich parallel zueinander einsetzen.

Laserdesorption/ionisation aus akustisch levitierten Tropfen Bei dieser Abfrage des akustisch levitierten Tropfens wurde die Laserwellenlänge durch den Einsatz eines Er:YAG Lasers auf polare Lösungsmittel optimiert. Die gewählte Wellenlänge von $\lambda = 2,94\ \mu\text{m}$ ermöglicht es nun gängige Lösungsmittel für die Laserdesorption/Ionisation, z.B. Wasser oder Alkohole, zu verwenden, da sie energetisch einem Quant in einer typischen OH-Streckschwingung entspricht. Dies hat eine hohe Absorption zur Folge. Das heißt, dass Energie in das Lösungsmittel bzw. in den Tropfen transferiert und eine Flüssigkeits-Desorption ohne die Zugabe eines Chromophors ermöglicht wird. Somit können gängige Lösungsvorschriften der klassischen Probenvorbereitung beibehalten und für ein entwickeltes TAS verwendet werden. Dies hat den Vorteil, dass ein weiterer Kontaminationspfad durch Änderung des Lösungsmittels ausgeschlossen wird. Die Verwendung gängiger Lösungsmittel und somit die Standardisierung des Prozesses ist entscheidend, damit Totalanalyzesysteme basierend auf akustischer Levitation und

Laserdesorption in Analyzelaboren überhaupt eingesetzt werden können. Insbesondere für biologisch relevante Proben sollte daher das TAS auf wässrige Medien optimiert sein.

Sonic Spray Ionisation Die SSI bietet zum Einen die Möglichkeit einer einheitlichen und global-erhältlichen Ionenquelle, die kostengünstig genug ist, um in regelmäßigen Intervallen ausgetauscht zu werden. Zum Anderen kann sie genutzt werden, um Sprayprozesse von binären Flüssig/gas-Systemen zu simulieren. Zunächst wurde die Nachweisempfindlichkeit der SSI als Ionenquelle für Analyten unterschiedlicher Größe untersucht. Im unteren Massenbereich bis hin zu kleinen Proteinen konnte eine für Analyseprozesse ausreichende Empfindlichkeit gefunden werden. Im Anschluss daran wurden Experimente zur Charakterisierung des erzeugten Sprays durchgeführt. Die mittels LIF experimentell erhaltenen Ergebnisse liefern Erkenntnisse über die Spraybildung und speziell über die räumliche Verteilung der solvatisierten und desolvatisierten Analytmoleküle im resultierenden Gas/flüssig-Aerosol. Dass hauptsächlich solvatisierte Analytmoleküle in die erste Pumpstufe des Massenspektrometers gelangen, zeigt die Relevanz des gewählten Einlasssystems. Innerhalb des kurzen Weges bis zum ersten Quadrupol-Ionenguide muss eine vollständige Desolvatation des Ions stattgefunden haben, um eine möglichst effiziente Transmission zu gewährleisten. Der Startpunkt für die konsekutive Desolvatation korreliert mit der ursprünglichen Tropfengröße: je kleiner die Tropfen, desto schneller findet die Desolvatisierung statt und umso effizienter ist diese Art einer Ionenquelle. Durch die Konstruktion eines individuellen Einlasses kann das System dieser Anforderung gerecht werden. Dieses Fazit zeigt, dass für alle möglichen Kopplungen des Tropfens an eine massenspektrometrische Analyse die Rolle des Einlasses erfolgsentscheidend ist und somit einen kritischen Bestandteil der Entwicklung bedeutet.

Field Induced Droplet Ionisation Assisted by Ultra Sound Diese Art der Generierung eines Sprays aus akustisch levitierten Tropfen konnte im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit erstmals realisiert werden. Um möglichst zwei Taylor-Cones an den gegenüberliegenden Sei-

ten eines levitierten Tropfens zu erzeugen, wurden zwei Ringelektroden angebracht, zwischen denen sich ein elektrisches Feld aufspannt. Entsprechend den Ladungen der im Tropfen bereits vorhandenen Ladungsträger wandern diese an das entsprechende Ende des Tropfens. Dort akkumulieren diese und bilden jeweils ein feines bis sehr feines Spray aus. Durch LIF-Experimente konnten diese Prozesse visualisiert werden und scheinen sich ähnlich den vorher mittels SSI simulierten Spraybildungen zu verhalten. Durch das aufgespannte elektrische Feld gewinnen zusätzliche instrumentelle Faktoren eine Rolle, wie die räumliche Anordnung der Ringelektroden zueinander und zur Einlassöffnung, wesentlich an Einfluss und spannen einen engen Parameterraum für einen störungsfreien Betrieb auf. Bei bereits kleinen Abweichungen von diesen stabilen Bedingungen, treffen freie Ionen verstärkt auf eine der Elektroden und entladen sich oder es kommt zu einem Überschlag zwischen den Elektroden, welcher zu einer Beeinträchtigung des Analysesystems führt. Die Technik kann eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung eines μ TAS spielen, da kleine Tropfen im System z.B. zum akustischen Feld coaxial mittels einem entwickelten Injektionssystems eingebracht werden können. Für Reaktionsmonitoring kann ein weiterer Reaktand hinzugegeben und im Anschluss eine automatisierte Analyseroutine durchgeführt werden. Dabei sind Sicherheitsmaßnahmen durch ein Gehäuse gut einzugrenzen. In diesem System können ebenfalls Standardlösungsmittel verwendet werden. Dabei sind lediglich die Materialparameter wie Oberflächenspannung und Viskosität zuvor in den Analysezyklen entsprechend der angelegten Spannungen zu berücksichtigen. So wird es zukünftig möglich sein mit dieser Technik ein Reaktionsmonitoring durch eine Mehrfachabfrage eines einzelnen μ L Tropfens zu realisieren.

Optische Spektroskopie in der Whispering Gallery Mode von levitierten Tropfen Durch Einkoppeln von Laserlicht in einen akustisch levitierten Tropfen konnten die sogenannten Whispering Gallery Modes entlang der Hauptachse des Tropfens angeregt werden. Wichtig ist es bei den verschiedenen möglichen Kopplungstechniken auf spezielle Nebenbedingungen zu ach-

ten, die sich aus der Levitationstechnik ergeben. Es hat sich gezeigt, dass die Verwendung von Lichtleitern hierfür nicht praktikabel ist sondern eine direkte Freistrahleinkopplung die besten Ergebnisse erzielt. Ist das Licht in den Tropfen transferiert worden, wird durch Totalreflektionen entlang des äquatorialen Perimeters das Licht auf einer zirkularen Bahn gehalten. Dabei wird vom Laserfarbstoff kontinuierlich Energie aufgenommen und dieser beginnt zu fluoreszieren. Diese ungerichtete Lichtemission wird auf Umlaufbahnen bestimmter Längen, welche die Resonanzbedingungen der WGM erfüllen, verstärkt. Die Verstärkung wird durch Lasingprozesse erzeugt. So wird es zukünftig möglich sein die Weglänge des Laserstrahls innerhalb des Tropfens zu verlängern und mit Hilfe spektroskopischer Methoden Informationen über die Komposition des Tropfens zu erhalten. Für μ TAS ergibt sich hieraus die Möglichkeit, das Wechselwirkungsvolumen zwischen Probe und Abfragelicht um viele Größenordnungen zu vergrößern. Dies ist erforderlich, da die kleinen Probenvolumina oftmals spektroskopische Abfragen ausschließen. Die Weglängenverlängerung innerhalb der WGM bedeutet, dass die Interaktionszeit zwischen Licht und Analyt ebenfalls verlängert wird und so gemäß Lambert Beer'schem Gesetz die Sensitivität deutlich gesteigert und eine Analyt-spezifische Analyse ermöglicht werden kann. Für (spuren-)analytische Fragestellungen ist es damit möglich Auskünfte über Qualität und Quantität des zu untersuchenden Analyten zu bekommen.

9.2 Fazit

Durch das Vermeiden von Wandkontakten während der Reaktionen und/oder Analysen in Mikroliter Bereich, können Nachteile der derzeit gängigen mikrofluidischen Systeme umgangen werden. Das bedeutet, dass, z.B. im Bereich der Spurenanalytik, solch ein sogenanntes „Lab-on-a-Drop“ durch die ausgeschlossenen Kontaminationspfade von großem Interesse sein wird. Weiterhin gibt es die Möglichkeit nicht nur einzelne (gesamte) Tropfen zu analysieren, sondern zukünftig auch ein Monitoring an ein und dem selben Tropfen durchzuführen.

Kapitel 9 Schlussbetrachtungen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Techniken erlauben es massenspektrometrische und spektroskopische/optische Analysen an akustisch levitierten Tropfen durchzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass dazu eine Vielzahl verschiedener Einflüsse auf Ionisationstechniken zu beachten sind und neben den eigentlichen Techniken die Anpassung der Geräte und Instrumente essentiell ist. Vor allem der Transfer von Substanz aus dem Tropfen in ein Massenspektrometer ist sehr aufwendig und muss verstanden werden. Dabei stellten sich zwei vielversprechende Techniken heraus: i) Laserdesorption/ionisation und ii) Field-induced Droplet Ionisation am levitierten Tropfen, mit den jeweils komplementären Vorteilen der Ionisationsprinzipien. Dank der Zugänglichkeit zum Tropfen kann nun in weiteren Schritten mit Hilfe von automatisierten Injektions- und Analyseprozessen ein komplettes Mikrototalanalysesystem entwickelt werden. Dieses soll für eine möglichst generalisierte Anwendung im Bereich der analytischen Chemie Einsatz finden.

Literaturverzeichnis

- [1] Ainhoa Letamendia, Celia Quevedo, Izaskun Ibarbia, Juan M Virto, Olaia Holgado, Maria Diez, Juan Carlos Izpisua Belmonte, and Carles Callol-Massot. Development and validation of an automated high-throughput system for zebrafish in vivo screenings. *PLoS One*, 7(5):e36690, 2012.
- [2] Markus de Raad, Curt R Fischer, and Trent R Northen. High-throughput platforms for metabolomics. *Current opinion in chemical biology*, 30:7–13, 2016.
- [3] Lorenz M Mayr and Dejan Bojanic. Novel trends in high-throughput screening. *Current opinion in pharmacology*, 9(5):580–588, 2009.
- [4] Li-Ping Li, Bao-Sheng Feng, Jian-Wang Yang, Cui-Lan Chang, Yu Bai, and Hu-Wei Liu. Applications of ambient mass spectrometry in high-throughput screening. *Analyst*, 138(11):3097–3103, 2013.
- [5] George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373, 2006.
- [6] J  r  my Bell, Estela Climent, Mandy Hecht, Merwe Buurman, and Knut Rurack. Combining a droplet-based microfluidic tubing system with gated indicator releasing nanoparticles for mercury trace detection. *ACS Sensors*, 1(4):334–338, 2016.
- [7] Andr  as Manz, N Graber, and H   M Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B: Chemical*, 1(1-6):244–248, 1990.
- [8] Petra S Dittrich and Andreas Manz. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(3):210–218, 2006.
- [9] Xiaojun Feng, Bi-Feng Liu, Jianjun Li, and Xin Liu. Advances in coupling microfluidic chips to mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 34(5):535–557, 2015.
- [10] Amar Oedit, Paul Vulto, Rawi Ramautar, Petrus W Lindenburg, and Thomas Hanke-meier. Lab-on-a-chip hyphenation with mass spectrometry: strategies for bioanalytical applications. *Current opinion in biotechnology*, 31:79–85, 2015.
- [11] Andrea J Bubendorfer, Bridget Ingham, John V Kennedy, and W Mike Arnold. Contamination of pdms microchannels by lithographic molds. *Lab on a Chip*, 13(22):4312–4316, 2013.

- [12] Kristina Georgieva, DJ Dijkstra, H Fricke, and N Willenbacher. Clogging of microchannels by nano-particles due to hetero-coagulation in elongational flow. *Journal of colloid and interface science*, 352(2):265–277, 2010.
- [13] N Morgner, J Hoffmann, H-D Barth, T Meier, and B Brutschy. Lilbid-mass spectrometry applied to the mass analysis of rna polymerase ii and an f l f o-atp synthase. *International Journal of Mass Spectrometry*, 277(1):309–313, 2008.
- [14] Arne Stindt, Merwe Albrecht, Ulrich Panne, and Jens Riedel. CO₂ laser ionization of acoustically levitated droplets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(22):7005, 2013.
- [15] Ronald L Grimm and JL Beauchamp. Field-induced droplet ionization mass spectrometry. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(51):14161–14163, 2003.
- [16] EH Brandt. Levitation in physics. *Science*, 243(4889):349–355, 1989.
- [17] Sabina Santesson and Staffan Nilsson. Airborne chemistry: acoustic levitation in chemical analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(7):1704–1709, 2004.
- [18] Vincent Vandaele, Pierre Lambert, and Alain Delchambre. Non-contact handling in microassembly: Acoustical levitation. *Precision Engineering*, 29(4):491–505, 2005.
- [19] Martin C Wilding, Mark Wilson, Oliver LG Alderman, Chris Benmore, JKR Weber, John B Parise, Anthony Tamalonis, and Lawrie Skinner. Low-dimensional network formation in molten sodium carbonate. *Scientific Reports*, 6, 2016.
- [20] A Ashkin and JM Dziedzic. Optical levitation of liquid drops by radiation pressure. *Science*, 187(4181):1073–1075, 1975.
- [21] Liselotte Jauffred, S Mohammad-Reza Taheri, Regina Schmitt, Heiner Linke, and Lene B Oddershede. Optical trapping of gold nanoparticles in air. *Nano letters*, 15(7):4713–4719, 2015.
- [22] Arthur F Hebard. A superconducting suspension with variable restoring force and low damping. *Review of Scientific Instruments*, 44(4):425–429, 1973.
- [23] F Hellman, EM Gyorgy, DW Johnson Jr, HM O’Bryan, and RC Sherwood. Levitation of a magnet over a flat type ii superconductor. *Journal of Applied physics*, 63(2):447–450, 1988.
- [24] Yujie Qin and Yunxing Shu. Investigation of the lateral reversible region of ybco bulk above a permanent magnet guideway. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 26(7):2391–2396, 2013.
- [25] Johann Gottlob Leidenfrost. *De aquae communis nonnullis qualitatibus tractatus*. Ove-nius, 1756.

- [26] Ali Hashmi, Yuhao Xu, Benjamin Coder, Paul A Osborne, Jonathon Spafford, Grant E Michael, Gan Yu, and Jie Xu. Leidenfrost levitation: beyond droplets. *Scientific reports*, 2, 2012.
- [27] Cédric Poulain, Antoine Dugué, Antoine Durieux, Nader Sadeghi, and Jérôme Duplat. The plasma levitation of droplets. *Applied Physics Letters*, 107(6):064101, 2015.
- [28] August Kundt. Ueber eine neue art akustischer staubfiguren und über die anwendung derselben zur bestimmung der schallgeschwindigkeit in festen körpern und gasen. *Annalen der Physik*, 203(4):497–523, 1866.
- [29] Karl Bücks and Hans Müller. Über einige beobachtungen an schwingenden piezoquarzen und ihrem schallfeld. *Zeitschrift für Physik*, 84(1-2):75–86, 1933.
- [30] Rudolf Tuckermann, Sigurd Bauerecker, and Bernd Neidhart. Schwebende tröpfchen: Levitation in ultraschallfeldern. *Physik in unserer Zeit*, 32(2):69–75, 2001.
- [31] A. Stindt, M. A. B. Andrade, M. Albrecht, J. C. Adamowski, U. Panne, and J. Riedel. Experimental and numerical characterization of the sound pressure in standing wave acoustic levitators. *Review of Scientific Instruments*, 85(1):15110, 2014.
- [32] Rudolf Tuckermann, Sigurd Bauerecker, and Bernd Neidhart. Evaporation rates of alkanes and alkanols from acoustically levitated drops. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 372(1):122–127, 2002.
- [33] MC Schlegel, K-J Wenzel, A Sarfraz, U Panne, and F Emmerling. A wall-free climate unit for acoustic levitators. *Review of Scientific Instruments*, 83(5):055101, 2012.
- [34] Jonas Schenk, Lisa Tröbs, Franziska Emmerling, Janina Kneipp, Ulrich Panne, and Merwe Albrecht. Simultaneous uv/vis spectroscopy and surface enhanced raman scattering of nanoparticle formation and aggregation in levitated droplets. *Analytical Methods*, 4(5):1252–1258, 2012.
- [35] Rainer Stosch and Heiko K Cammenga. Molecular interactions in mixed monolayers of octadecanoic acid and three related amphiphiles. *Journal of colloid and interface science*, 230(2):291–297, 2000.
- [36] Runar Eberhardt and Bernd Neidhart. Acoustic levitation device for sample pretreatment in microanalysis and trace analysis. *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry*, 365(6):475–479, 1999.
- [37] Rudolf Tuckermann, Bernd Neidhart, Ernst G Lierke, and Sigurd Bauerecker. Trapping of heavy gases in stationary ultrasonic fields. *Chemical Physics Letters*, 363(3):349–354, 2002.
- [38] S. Santesson and S. Nilsson. Airborne chemistry: acoustic levitation in chemical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(7):1704–1709, 2004.

- [39] A. Scheeline and R. L. Behrens. Potential of levitated drops to serve as microreactors for biophysical measurements. *Biophysical Chemistry*, 165:1–12, 2012.
- [40] N. J. Mason, E. A. Drage, S. M. Webb, A. Dawes, R. McPheat, and G. Hayes. The spectroscopy and chemical dynamics of microparticles explored using an ultrasonic trap. *Faraday Discussions*, 137:367–376, 2008.
- [41] Sabina Santesson, Eva Degerman, Patrik Rorsman, Thomas Johansson, Sandra Lemos, and Staffan Nilsson. Cell–cell communication between adipocytes and pancreatic β -cells in acoustically levitated droplets. *Integrative Biology*, 1(10):595–601, 2009.
- [42] Zakiah N Pierre, Christopher R Field, and Alexander Scheeline. Sample handling and chemical kinetics in an acoustically levitated drop microreactor. *Analytical Chemistry*, 81(20):8496–8502, 2009.
- [43] Jörg Polte, T Torsten Ahner, Friedmar Delissen, Sergey Sokolov, Franziska Emmerling, Andreas F Thünemann, and Ralph Kraehnert. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ xanes and saxs evaluation. *Journal of the American Chemical Society*, 132(4):1296–1301, 2010.
- [44] Arne Stindt. *Probing levitated droplets with mass spectrometry*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2016.
- [45] Joseph John Thomson. Bakerian lecture: Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89(607):1–20, 1913.
- [46] AJ Dempster. A new method of positive ray analysis. *Physical Review*, 11(4):316, 1918.
- [47] John B Fenn, Matthias Mann, Chin Kai Meng, Shek Fu Wong, and Craig M Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71, 1989.
- [48] EC Horning, MG Horning, DI Carroll, I Dzidic, and RN Stillwell. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Analytical Chemistry*, 45(6):936–943, 1973.
- [49] Franz Hillenkamp, Michael Karas, Ronald C Beavis, and Brian T Chait. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical chemistry*, 63(24):1193A–1203A, 1991.
- [50] WE Stephens. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. In *Physical Review*, volume 69, pages 691–691. American Physical Soc. One Physics Ellipse, College PK, MD 20740-3844 USA, 1946.
- [51] BA Mamyrin. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 131:1–19, 1994.

- [52] John Coles and Michael Guilhaus. Orthogonal acceleration—a new direction for time-of-flight mass spectrometry: fast, sensitive mass analysis for continuous ion sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 12(5):203–213, 1993.
- [53] Michael S Westphall, Kaveh Jorabchi, and Lloyd M Smith. Mass spectrometry of acoustically levitated droplets. *Analytical chemistry*, 80(15):5847–5853, 2008.
- [54] Stephan E. Wolf, Jork Leiterer, Michael Kappl, Franziska Emmerling, and Wolfgang Tremel. Early homogenous amorphous precursor stages of calcium carbonate and subsequent crystal growth in levitated droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 130(37):12342–12347, 2008.
- [55] Sang K Chung and Eugene H Trinh. Containerless protein crystal growth in rotating levitated drops. *Journal of Crystal Growth*, 194(3):384–397, 1998.
- [56] Friedmar Delissen, Jork Leiterer, Ralf Bienert, Franziska Emmerling, and Andreas F. Thuenemann. Agglomeration of proteins in acoustically levitated droplets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(1-2):161–165, 2008.
- [57] D. D. Weis and J. D. Nardozzi. Enzyme kinetics in acoustically levitated droplets of supercooled water: A novel approach to cryoenzymology. *Analytical Chemistry*, 77(8):2558–2563, 2005.
- [58] Jonas Schenk, Ulrich Panne, and Merwe Albrecht. Interaction of levitated ionic liquid droplets with water. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(48):14171–14177, 2012.
- [59] F Priego-Capote and Luque de Castro. Ultrasound-assisted levitation: Lab-on-a-drop. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(9):856–867, 2006.
- [60] ZY Hong, WJ Xie, and B Wei. Acoustic levitation with self-adaptive flexible reflectors. *Review of Scientific Instruments*, 82(7):074904, 2011.
- [61] Maria Petersson, Johan Nilsson, Lars Wallman, Thomas Laurell, Jonas Johansson, and Staffan Nilsson. Sample enrichment in a single levitated droplet for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 714(1):39–46, 1998.
- [62] Sabina Santesson, Irene Barinaga-Rementeria Ramírez, Peter Viberg, Bengt Jergil, and Staffan Nilsson. Affinity two-phase partitioning in acoustically levitated drops. *Analytical chemistry*, 76(2):303–308, 2004.
- [63] G Brenn, LJ Deviprasath, F Durst, and C Fink. Evaporation of acoustically levitated multi-component liquid droplets. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 50(25):5073–5086, 2007.
- [64] Weiyu Ran, Steven Fredericks, and John R Saylor. Shape oscillation of a levitated drop in an acoustic field. *arXiv preprint arXiv:1310.2967*, 2013.

- [65] Jacob T Shelley, Arne Stindt, Jens Riedel, and Carsten Engelhard. Time-resolved mass-spectral characterization of ion formation from a low-frequency, low-temperature plasma probe ambient ionization source. *J. Anal. At. Spectrom.*, 29(2):359–366, 2014.
- [66] Andrew N Krutchinsky, Júlio C Padovan, Herbert Cohen, and Brian T Chait. Maximizing ion transmission from atmospheric pressure into the vacuum of mass spectrometers with a novel electrospray interface. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 26(4):649–658, 2015.
- [67] Michael S. Westphall, Kaveh Jorabchi, and Lloyd M. Smith. Mass spectrometry of acoustically levitated droplets. *Analytical Chemistry*, 80(15):5847, 2008.
- [68] V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout, M. A. Yakshin, C. R. Prasad, H. S. Lee, and V. M. Doroshenko. Desorption/ionization of biomolecules from aqueous solutions at atmospheric pressure using an infrared laser at 3 μ m. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(4):354–361, 2002.
- [69] Erdmann Rapp, Aleš Charvát, Alexander Beinsen, Uwe Plessmann, Udo Reichl, Andreas Seidel-Morgenstern, Henning Urlaub, and Bernd Abel. Atmospheric Pressure Free Liquid Infrared MALDI Mass Spectrometry: Toward a combined ESI/MALDI-Liquid Chromatography Interface. *Analytical Chemistry*, 81(1):443–452, 2009.
- [70] Sandra Schulze, Maik Pahl, Ferdinand Stolz, Johannes Appun, Bernd Abel, Christoph Schneider, and Detlev Belder. Liquid beam desorption mass spectrometry for the investigation of continuous flow reactions in microfluidic chips. *Analytical Chemistry*, 2017.
- [71] Andreas Rohlfing, Christoph Menzel, Lalit M Kukreja, Franz Hillenkamp, and Klaus Dreisewerd. Photoacoustic analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization processes with pulsed infrared lasers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(44):12275–12286, 2003.
- [72] A. Leisner, A. Rohlfing, U. Rohling, K. Dreisewerd, and F. Hillenkamp. Time-resolved imaging of the plume dynamics in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization with a glycerol matrix. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(23):11661–11666, 2005.
- [73] CR Blakley and ML Vestal. Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 55(4):750–754, 1983.
- [74] Alfred Vogel and Vasan Venugopalan. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemical Reviews*, 103(1):557–644, 2003.
- [75] George M Hale and Marvin R Querry. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. *Applied Optics*, 12(3):555–563, 1973.
- [76] V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout, B. D. Musselman, and V. M. Doroshenko. Atmospheric pressure laser desorption/ionization on porous silicon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(18):1737–1742, 2002.

- [77] H. Lioe, R. A. J. O'Hair, and G. E. Reid. Gas phase ion chemistry of biomolecules. part 37 - gas-phase reactions of protonated tryptophan. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(1):65–76, 2004.
- [78] Andreas Bierstedt, Arne Stindt, Carsten Warschat, Ulrich Panne, and Jens Riedel. High repetition rate atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization in combination with liquid matrices. *European Journal of Mass Spectrometry*, 20(5):367–374, 2014.
- [79] M. Mann, C. K. Meng, and J. B. Fenn. Interpreting mass-spectra of multiply charged ions. *Analytical Chemistry*, 61(15):1702–1708, 1989.
- [80] S. Trimpin, E. D. Inutan, T. N. Herath, and C. N. McEwen. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry method for selectively producing either singly or multiply charged molecular ions. *Analytical Chemistry*, 82(1):11–15, 2010.
- [81] R. Cramer, A. Pirkel, F. Hillenkamp, and K. Dreisewerd. Liquid ap-uv-maldi enables stable ion yields of multiply charged peptide and protein ions for sensitive analysis by mass spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition*, 52(8):2364–2367, 2013.
- [82] Annika Koch, Andreas Schnapp, Jens Soltwisch, and Klaus Dreisewerd. Generation of multiply charged peptides and proteins from glycerol-based matrices using lasers with ultraviolet, visible and near-infrared wavelengths and an atmospheric pressure ion source. *International Journal of Mass Spectrometry*, pages –, 2016.
- [83] John Bartlett Segur and Helen E Oberstar. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions. *Industrial & Engineering Chemistry*, 43(9):2117–2120, 1951.
- [84] Begoña González, Noelia Calvar, Elena Gómez, and Ángeles Domínguez. Density, dynamic viscosity, and derived properties of binary mixtures of methanol or ethanol with water, ethyl acetate, and methyl acetate at $t=(293.15, 298.15, \text{ and } 303.15)$ k. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 39(12):1578–1588, 2007.
- [85] P. Kebarle. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(7):804–817, 2000.
- [86] Carsten Warschat, Arne Stindt, Ulrich Panne, and Jens Riedel. Mass spectrometry of levitated droplets by thermally unconfined infrared-laser desorption. *Analytical chemistry*, 87(16):8323–8327, 2015.
- [87] Atsumu Hirabayashi, Minoru Sakairi, and Hideaki Koizumi. Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 66(24):4557–4559, 1994.
- [88] Masamichi Yamashita and John B Fenn. Electrospray ion source. another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20):4451–4459, 1984.

- [89] Manolis M Antonakis, Alexandra Tsirigotaki, Katerina Kanaki, Constantinos J Milios, and Spiros A Pergantis. Bipolar mass spectrometry of labile coordination complexes, redox active inorganic compounds, and proteins using a glass nebulizer for sonic-spray ionization. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 24(8):1250–1259, 2013.
- [90] Zoltan Takats, Sergio C Nanita, and R Graham Cooks. Serine octamer reactions: indicators of prebiotic relevance. *Angewandte Chemie*, 115(30):3645–3647, 2003.
- [91] Zoltan Takats, Sergio C Nanita, R Graham Cooks, Gitta Schlosser, and Karoly Vekey. Amino acid clusters formed by sonic spray ionization. *Analytical chemistry*, 75(6):1514–1523, 2003.
- [92] Renato Haddad, Regina Sparrapan, and Marcos N Eberlin. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(19):2901–2905, 2006.
- [93] Vanessa G Santos, Thais Regiani, Fernanda FG Dias, Wanderson Romao, Jose Luis Paz Jara, Clecio F Klitzke, Fernando Coelho, and Marcos N Eberlin. Venturi easy ambient sonic-spray ionization. *Analytical chemistry*, 83(4):1375–1380, 2011.
- [94] Nicholas D Chubaty, Tongwen Wang, and Charles N McEwen. More inclusive or selective ionization for mass spectrometry using obstructive sonic spray ionization and voltage polarity switching. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(23):2763–2769, 2012.
- [95] David Touboul, Matthias Conradin Jecklin, and Renato Zenobi. Ion internal energy distributions validate the charge residue model for small molecule ion formation by spray methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(7):1062–1068, 2008.
- [96] Arno Wortmann, Anna Kistler-Momotova, Renato Zenobi, Martin C Heine, Oliver Wilhelm, and Sotiris E Pratsinis. Shrinking droplets in electrospray ionization and their influence on chemical equilibria. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(3):385–393, 2007.
- [97] James N Smith, Richard C Flagan, and JL Beauchamp. Droplet evaporation and discharge dynamics in electrospray ionization. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(42):9957–9967, 2002.
- [98] Konstantin Chingin, Vladimir Frankevich, Roman M Balabin, Konstantin Barylyuk, Huanwen Chen, Rui Wang, and Renato Zenobi. Direct access to isolated biomolecules under ambient conditions. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(13):2358–2361, 2010.
- [99] Lloyd W Zilch, Joshua T Maze, John W Smith, George E Ewing, and Martin F Jarrold. Charge separation in the aerodynamic breakup of micrometer-sized water droplets. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112(51):13352–13363, 2008.

- [100] Atsumu Hirabayashi and Juan Fernandez de la Mora. Charged droplet formation in sonic spray. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 175(3):277–282, 1998.
- [101] Peter James. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics*, 30(04):279–331, 1997.
- [102] Richard D Smith, Joseph A Loo, Rachel R Ogorzalek Loo, Mark Busman, and Harold R Udseth. Principles and practice of electrospray ionization—mass spectrometry for large polypeptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews*, 10(5):359–452, 1991.
- [103] Atsumu Hirabayashi, Minoru Sakairi, and Hideaki Koizumi. Sonic spray mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 67(17):2878–2882, 1995.
- [104] Christie G Enke. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Analytical Chemistry*, 69(23):4885–4893, 1997.
- [105] F Renth, J Riedel, and F Temps. Inversion of velocity map ion images using iterative regularization and cross validation. *Review of scientific instruments*, 77(3):033103, 2006.
- [106] Eric W Hansen and Phaih-Lan Law. Recursive methods for computing the abel transform and its inverse. *JOSA A*, 2(4):510–520, 1985.
- [107] RN Bracewell. The fourier transform and its applications (revised) mcgraw-hill. *New York*, pages 104–108, 1986.
- [108] I Lopez Arbeloa and KK Rohatgi-Mukherjee. Solvent effect on photophysics of the molecular forms of rhodamine b. solvation models and spectroscopic parameters. *Chemical Physics Letters*, 128(5):474–479, 1986.
- [109] Tzyh Lee Chang and Herbert C Cheung. Solvent effects on the photoisomerization rates of the zwitterionic and the cationic forms of rhodamine b in protic solvents. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(12):4874–4878, 1992.
- [110] Sandeep K Sagoo and Rebecca A Jockusch. The fluorescence properties of cationic rhodamine b in the gas phase. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 220(2):173–178, 2011.
- [111] JV Iribarne and BA Thomson. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6):2287–2294, 1976.
- [112] Paul Kebarle and Udo H Verkerk. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(6):898–917, 2009.
- [113] A Roshko and HW Liepmann. Elements of gas dynamics, 1957.

- [114] Arne Stindt, Carsten Warschat, Andreas Bierstedt, Ulrich Panne, and Jens Riedel. Characterization of an inexpensive sonic spray ionization source using laser induced fluorescence imaging and mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 20(1):21–29, 2013.
- [115] DB Hager and NJ Dovichi. Behavior of microscopic liquid droplets near a strong electrostatic field: droplet electrospray. *Analytical Chemistry*, 66(9):1593–1594, 1994.
- [116] Denis Duft, Tobias Achtzehn, Rene Müller, Bernd A Huber, and Thomas Leisner. Coulomb fission: Rayleigh jets from levitated microdroplets. *Nature*, 421(6919):128–128, 2003.
- [117] T Achtzehn, R Müller, D Duft, and T Leisner. The coulomb instability of charged microdroplets: dynamics and scaling. *The European Physical Journal D-Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics*, 34(1):311–313, 2005.
- [118] Lord Rayleigh. Xx. on the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 14(87):184–186, 1882.
- [119] Geoffrey Taylor. Disintegration of water drops in an electric field. In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, volume 280, pages 383–397. The Royal Society, 1964.
- [120] Janhavi S Raut, Sathish Akella, AmitKumar Singh, and Vijay M Naik. Catastrophic drop breakup in electric field. *Langmuir*, 25(9):4829–4834, 2009.
- [121] Oleg V Kim and Patrick F Dunn. Controlled production of droplets by in-flight electrospraying. *Langmuir*, 26(20):15807–15813, 2010.
- [122] Kenzo Hiraoka, Kentaro Nishidate, Kunihiro Mori, Daiki Asakawa, and Shigeo Suzuki. Development of probe electrospray using a solid needle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(18):3139–3144, 2007.
- [123] Jiangjiang Liu, He Wang, Nicholas E Manicke, Jin-Ming Lin, R Graham Cooks, and Zheng Ouyang. Development, characterization, and application of paper spray ionization. *Analytical chemistry*, 82(6):2463–2471, 2010.
- [124] Ronald L Grimm and JL Beauchamp. Dynamics of field-induced droplet ionization: time-resolved studies of distortion, jetting, and progeny formation from charged and neutral methanol droplets exposed to strong electric fields. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(16):8244–8250, 2005.
- [125] Ronald L Grimm, Robert Hodyss, and JL Beauchamp. Probing interfacial chemistry of single droplets with field-induced droplet ionization mass spectrometry: Physical adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons and ozonolysis of oleic acid and related compounds. *Analytical chemistry*, 78(11):3800–3806, 2006.

- [126] Jae Yoon Ko, Sun Mi Choi, Young Min Rhee, JL Beauchamp, and Hugh I Kim. Studying interfacial reactions of cholesterol sulfate in an unsaturated phosphatidylglycerol layer with ozone using field induced droplet ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(1):141–152, 2012.
- [127] J. Laskin, A. Laskin, and S. A. Nizkorodov. New mass spectrometry techniques for studying physical chemistry of atmospheric heterogeneous processes. *International Reviews in Physical Chemistry*, 32(1):128, 2013.
- [128] Gonzalo Vazquez, Estrella Alvarez, and Jose M Navaza. Surface tension of alcohol water+ water from 20 to 50. degree. c. *Journal of chemical and engineering data*, 40(3):611–614, 1995.
- [129] Leandra P Santos, Telma RD Ducati, Lia BS Balestrin, and Fernando Galembeck. Water with excess electric charge. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(22):11226–11232, 2011.
- [130] Ana Cristina Cabral. *Acoustic "Wall-Less" Test Tubes for Cell Biology in Type 2 Diabetes Related Research*. PhD thesis, Universidade da Beira Interior, 2008.
- [131] Lee Chuin Chen, Satoshi Ninomiya, and Kenzo Hiraoka. Super-atmospheric pressure ionization mass spectrometry and its application to ultrafast online protein digestion analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(6):396–411, 2016.
- [132] Werner Siemens. Ueber die elektrostatische induction und die verzögerung des stroms in flaschendrahten. *Annalen der Physik*, 178(9):66–122, 1857.
- [133] Jia Liu, Bo Qiu, and Hai Luo. Fingerprinting of yogurt products by laser desorption spray post-ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(9):1365–1370, 2010.
- [134] Fengjian Shi, Paul M Flanigan IV, Jieutonne J Archer, and Robert J Levis. Ambient molecular analysis of biological tissue using low-energy, femtosecond laser vaporization and nanospray postionization mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 27(3):542–551, 2016.
- [135] Markus Haapala, Jaroslav Pól, Ville Saarela, Ville Arvola, Tapio Kotiaho, Raimo A Ketola, Sami Franssila, Tiina J Kauppila, and Risto Kostiainen. Desorption atmospheric pressure photoionization. *Analytical chemistry*, 79(20):7867–7872, 2007.
- [136] B Spengler, U Bahr, M Karas, and F Hillenkamp. Postionization of laser-desorbed organic and inorganic compounds in a time of flight mass spectrometer. 1988.
- [137] Robert B Cody, James A Laramée, and H Dupont Durst. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical Chemistry*, 77(8):2297–2302, 2005.

- [138] Elizabeth A Crawford, Cemal Esen, and Dietrich A Volmer. Real time monitoring of containerless microreactions in acoustically levitated droplets via ambient ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 88(17):8396–8403, 2016.
- [139] Andreas Bierstedt and Jens Riedel. High-repetition rate laser ablation coupled to dielectric barrier discharge postionization for ambient mass spectrometry. *Methods*, 2016.
- [140] Andreas Bierstedt and Jens Riedel. Airborne laser-spark for ambient desorption/ionisation. *European Journal of Mass Spectrometry*, 22(3):105–114, 2016.
- [141] Na Na, Mengxia Zhao, Sichun Zhang, Chengdui Yang, and Xinrong Zhang. Development of a dielectric barrier discharge ion source for ambient mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(10):1859–1862, 2007.
- [142] Yi-Ming Ling. Probe diagnosis of electron temperature and electron energy distribution in low-pressure dielectric barrier discharge. *Physics of Plasmas (1994-present)*, 12(11):113504, 2005.
- [143] N Masoud, K Martus, and Kurt Becker. Vuv emission from a cylindrical dielectric barrier discharge in ar and in ar/n2 and ar/air mixtures. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(11):1674, 2005.
- [144] Ulrich Kogelschatz. Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma chemistry and plasma processing*, 23(1):1–46, 2003.
- [145] Jason D Harper, Nicholas A Charipar, Christopher C Mulligan, Xinrong Zhang, R Graham Cooks, and Zheng Ouyang. Low-temperature plasma probe for ambient desorption ionization. *Analytical chemistry*, 80(23):9097–9104, 2008.
- [146] Jacob T Shelley, George C-Y Chan, and Gary M Hieftje. Understanding the flowing atmospheric-pressure afterglow (fapa) ambient ionization source through optical means. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(2):407–417, 2012.
- [147] Scott A McLuckey, Gary L Glish, Keiji G Asano, and Barry C Grant. Atmospheric sampling glow discharge ionization source for the determination of trace organic compounds in ambient air. *Analytical Chemistry*, 60(20):2220–2227, 1988.
- [148] Andreas Bierstedt, Ulrich Panne, Knut Rurack, and Jens Riedel. Characterization of two modes in a dielectric barrier discharge probe by optical emission spectroscopy and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(12):2496–2506, 2015.
- [149] DI Carroll, I Dzidic, RN Stillwell, MG Horning, and EC Horning. Subpicogram detection system for gas phase analysis based upon atmospheric pressure ionization (api) mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 46(6):706–710, 1974.

- [150] Sonja Klee, Marco Thinius, Klaus J Brockmann, and Thorsten Benter. Capillary atmospheric pressure chemical ionization using liquid point electrodes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(14):1591–1600, 2014.
- [151] Jacob T Shelley, Arne Stindt, Jens Riedel, and Carsten Engelhard. Time-resolved mass-spectral characterization of ion formation from a low-frequency, low-temperature plasma probe ambient ionization source. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(2):359–366, 2014.
- [152] Arne Stindt. *Probing levitated droplets with mass spectrometry*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, 103-130, 2016.
- [153] Alessandro Chiasera, Yannick Dumeige, Patrice Feron, Maurizio Ferrari, Yoann Jestin, Gualtiero Nunzi Conti, Stefano Pelli, Silvia Soria, and Giancarlo C Righini. Spherical whispering-gallery-mode microresonators. *Laser & Photonics Reviews*, 4(3):457–482, 2010.
- [154] Monica Agarwal and Iwao Teraoka. Whispering gallery mode dip sensor for aqueous sensing. *Analytical chemistry*, 87(20):10600–10604, 2015.
- [155] Giancarlo C Righini and Silvia Soria. Biosensing by wgm microspherical resonators. *Sensors*, 16(6):905, 2016.
- [156] Tetsuji Yano, Tetsuo Kishi, and Tsutaru Kumagai. Glass microspheres for optics. *International Journal of Applied Glass Science*, 6(4):375–386, 2015.
- [157] A Kiraz, A Sennaroglu, S Doğanay, MA Dünder, A Kurt, H Kalaycıoğlu, and AL Demirel. Lasing from single, stationary, dye-doped glycerol/water microdroplets located on a superhydrophobic surface. *Optics communications*, 276(1):145–148, 2007.
- [158] Lina He, Şahin Kaya Özdemir, and Lan Yang. Whispering gallery microcavity lasers. *Laser & Photonics Reviews*, 7(1):60–82, 2013.
- [159] SM Spillane, TJ Kippenberg, OJ Painter, and KJ Vahala. Ideality in a fiber-taper-coupled microresonator system for application to cavity quantum electrodynamics. *Physical Review Letters*, 91(4):043902, 2003.
- [160] Noha Gaber, Maurine Malak, Xichen Yuan, Kim Ngoc Nguyen, Philippe Basset, Elodie Richalot, Dan Angelescu, and Tarik Bourouina. On the free-space gaussian beam coupling to droplet optical resonators. *Lab on a Chip*, 13(5):826–833, 2013.
- [161] Shi-Xiong Qian, Judith B Snow, Huey-Ming Tzeng, and Richard K Chang. Lasing droplets: highlighting the liquid-air interface by laser emission. *Science*, 231(4737):486–488, 1986.
- [162] J Schafer, Jessica P Mondia, Rachit Sharma, ZH Lu, AS Susa, AL Rogach, and LJ Wang. Quantum dot microdrop laser. *Nano letters*, 8(6):1709–1712, 2008.

- [163] H Azzouz, L Alkhafadiji, Søren Balslev, J Johansson, Niels Asger Mortensen, Staffan Nilsson, and Anders Kristensen. Levitated droplet dye laser. *Optics express*, 14(10):4374–4379, 2006.
- [164] David Brewster. On the laws which regulate the polarisation of light by reflexion from transparent bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 105:125–159, 1815.
- [165] Akihiro Tomioka, Atsushi Fujimoto, Shinji Kinoshita, Takahiro Yamauchi, and Tadashi Kourahama. Novel photoactive aggregates of rhodamine 6g: Dequenched and quasi-stable aggregates induced by a dewetting process. *Ultramicroscopy*, 108(10):1013–1020, 2008.